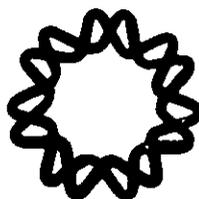


0059/  
15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA MOLECULAR



299207

Caracterización de los canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar que participan en la respuesta al Speract.

TESIS

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Bioquímicas

presenta

Daniel Paulo Sánchez Herrera

Asesor: Dr. Alberto Darszon Israel

2001  
SANCHEZ HERRERA, DANIEL PAULO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*A Mariana,  
por su amor y motivación.  
Te Amo.*

*A mis padres, Enrique y Olivia,  
por su ejemplo y amor.*

*A mis hermanos, Tere, Enrique y Rafael,  
por su apoyo incondicional.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Alberto Darszon por su dirección y apoyo,  
gracias por distinguirme con tu confianza y amistad.

A la Dra. Claudia Treviño, por su amistad y apoyo en la realización de los  
experimentos de inmunofluorescencia

A Ignacio, Takuya, José Luis, Felipe, Gabriel, Esmeralda, Gisela, Yuyu,  
Angelina, Otilia, Blanca, Carmen, Arturo y Ricardo, por su amistad.

A Francisca Candelario, María de la Paz Colín, Antonia Gama y Juan Monroy  
por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. Lourival Possani, al Dr. Ricardo Félix, al Dr. Omar Pantoja, a la Dra. Alejandra  
Bravo, al Dr. Jean Louis Charli y al Dr. Fernando Zamudio que conformaron  
el honorable jurado por sus comentarios y sugerencias

A la Dra. Susana López, al Dr. Omar Pantoja, al Dr. Froylan Gómez y a la Dra. Hilda  
Lomelí, por su asesoría como miembros de los comités tutorales  
durante mis estudios de posgrado.

A CONACyT por el apoyo económico a través de las becas-crédito  
que me otorgaron para la realización de mis estudios de posgrado.

A CONACyT, DGAPA-UNAM, DGEP-UNAM, Howard Huges Medical Institute e  
International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, por el apoyo económico  
otorgado al laboratorio para la realización de este proyecto.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Alberto Darszon,  
en el Departamento de Genética y Fisiología Molecular  
del Instituto de Biotecnología  
de la Universidad Nacional Autónoma de México,  
Campus Cuernavaca, Morelos.

## ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| ÍNDICE.....  | v   |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....   | vii |
| ABREVIATURAS.....  | ix  |
| RESUMEN. ....  | x   |
| SUMMARY.....   | xi  |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 1   |
| A. El espermatozoide del erizo de mar.....   | 2   |
| B. Respuesta del espermatozoide a los componentes de la matriz extracelular del óvulo..... | 3   |
| B.1. El Speract en la fisiología del espermatozoide.....                                   | 4   |
| B.2. La reacción acrosomal en el erizo de mar.....   | 7   |
| C. Canales iónicos.....  | 8   |
| C.1. Canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar.....                              | 10  |
| C.2. Canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos.....     | 12  |
| C.3. Canales activados por nucleótidos cíclicos.....                                       | 15  |
| II. OBJETIVOS.....   | 18  |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 19  |
| A. Material Biológico. ....  | 19  |
| B. Electrofisiología.....  | 19  |
| C. Análisis de los datos electrofisiológicos.....  | 21  |
| D. Experimentos de inmunocitoquímica.....  | 25  |
| IV. RESULTADOS.....  | 26  |
| A. Registro electrofisiológico de los canales iónicos de espermatozoides hinchados.....    | 26  |

|   |    |
|---|----|
| B. Activación de canales iónicos del espermatozoide por el Speract..... | 27 |
| C. Activación de un canal de $K^+$ por GMPc.....                        | 35 |
| D. Activación de canales catiónicos por el AMPc.....                    | 42 |
| V. DISCUSIÓN .....  | 55 |
| A. Canales activados por el Speract.....                                | 55 |
| B. Canal de $K^+$ activado por GMPc.....                                | 57 |
| C. Canales activados por el AMPc.....                                   | 59 |
| D. Modelo de los eventos iónicos durante la respuesta al Speract.....   | 64 |
| VI. CONCLUSIONES.....   | 67 |
| VII. PERSPECTIVAS .....   | 68 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA.....  | 70 |
| VIII. APÉNDICE.....   | 77 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

**Figura 1.** Esquema del espermatozoide de erizo de mar..... 3

**Figura 2.** Esquema de la interacción espermatozoide-óvulo en el erizo de mar..... 5

**Figura 3.** Esquema de la subunidad  $\alpha$  de un canal de  $K^+$  dependiente de voltaje..... 9

**Figura 4.** Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*)..... 20

**Figura 5.** El Speract activa diferentes canales iónicos en espermatozoides hinchados del erizo de mar..... 28

**Figura 6.** El Speract activa diferentes niveles de conductancia en espermatozoides hinchados de erizo de mar..... 29

**Tabla I.** Conductancias unitarias presentes en los experimentos de *patch-clamp* en los que se observó la activación por Speract en espermatozoides hinchados de erizo de mar..... 31

**Figura 7.** El Speract activa un canal catiónico del espermatozoide de erizo de mar..... 32

**Figura 8.** Canal catiónico de 47 pS registrado en espermatozoides hinchados del erizo de mar..... 33

**Figura 9.** Modulación por 8BrGMPc del canal de 15 pS de espermatozoides hinchados del erizo de mar..... 36

**Figura 10.** Canal de 15 pS selectivo a  $K^+$  de espermatozoides hinchados del erizo de mar... 38

**Figura 11.** El DCB bloquea el canal activado de 15 pS activado por 8BrGMPc..... 39

**Figura 12.** El canal de 15 pS se activa directamente por GMPc..... 41

**Figura 13.** El 8BrGMPc activa una corriente iónica en presencia de cationes divalentes..... 43

**Tabla II.** Parámetros biofísicos calculados para la corriente iónica activada por 8BrGMPc en espermatozoides hinchados de erizo de mar..... 43

**Figura 14.** Modulación del canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar por dbAMPc..... 45

**Figura 15.** El 8BrAMPc también activa al canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar..... 46

**Figura 16.** Conductancias de 31 y 43 pS registradas en parches de espermatozoides hinchados del erizo de mar..... 49

**Figura 17.** Inmunolocalización del canal SpHCN en espermatozoides de *L. pictus*..... 50

**Figura 18.** Modulación del canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar por IBMX..... 53

**Figura 19.** La modulación por AMPc del canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar no parece ser por fosforilación..... 54

**Figura 20.** Modelo propuesto de los eventos principales durante la respuesta al Speract en el flagelo de espermatozoides del erizo de mar..... 66

## ABREVIATURAS

|   |  |
|---|--|
| <b>AMA</b> , agua de mar artificial;  | <b>HEPES</b> , ácido hidroxietilpiperazina etano sulfónico;  |
| <b>AMA1:10</b> , agua de mar diluida 10 veces;  | <b>HvHCN</b> , canal activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos de <i>Heliothes viscerens</i> ;                        |
| <b>AMPc</b> , adenosina monofosfato cíclica;  | <b>H7</b> , 1-5- (isoquinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina;  |
| <b>8BrAMPc</b> , 8-bromoadenosina 3',5'- monofosfato cíclica;   | <b>Hz</b> , Hertz;   |
| <b>8BrGMPc</b> , 8-bromoguanosina 3',5'- monofosfato cíclica;   | <b>IBMX</b> , 3-isobutil-1-metilxantina;   |
| <b>[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub></b> , concentración de calcio intracelular;  | <b>kDa</b> , kilodaltones;   |
| <b>CNG</b> , <i>cyclic nucleotide gated</i> ;   | <b>kHz</b> , kilohertz;  |
| <b>dbAMPc</b> , N2,2'-O-dibutiril adenosina 3',5'- monofosfato cíclica;   | <b>M</b> , molar;  |
| <b>dbGMPc</b> , N2,2'-O-dibutiril guanosina 3',5'- monofosfato cíclica;   | <b>mM</b> , milimolar;   |
| <b>DmHCN</b> , canal activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos de <i>Drosophila melanogaster</i> ; | <b>mOsm</b> , miliosmoles  |
| <b>E<sub>aplicado</sub></b> , potencial aplicado en la pipeta   | <b>ms</b> , milisegundos;  |
| <b>EDTA</b> , ácido tetra acético etilenedinitrilo;   | <b>mV</b> , milivoltios;   |
| <b>EGTA</b> , ácido tetra acético etilen glicol-bis(β-aminoetil eter);  | <b>nM</b> , nanomolar;   |
| <b>Em</b> , potencial de membrana;  | <b>pA</b> , picoamperios;  |
| <b>EMR</b> , potencial de membrana en el reposo;  | <b>patch-clamp</b> , fijación de voltaje en microáreas de membrana;  |
| <b>E<sub>rev</sub></b> , potencial de inversión;  | <b>pHi</b> , pH intracelular   |
| <b>F</b> , constante de Faraday;  | <b>P<sub>K</sub>/P<sub>Na</sub></b> , razón de permeabilidad entre K <sup>+</sup> y Na <sup>+</sup> ;  |
| <b>GFS</b> , glicoconjugado de fucosa sulfatada;  | <b>pS</b> , picosiemens,   |
| <b>GMPc</b> , guanosina monofosfato cíclica;  | <b>R</b> , constante de los gases;   |
| <b>[GMPc]<sub>i</sub></b> , concentración de GMPc intracelular;   | <b>SAP</b> , <i>sperm-activating peptides</i>  |
| <b>HCN</b> , <i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated</i> ;   | <b>SPIH</b> ó <b>SpHCN</b> , canal activado por hiperpolarización y modulado por nucleótidos cíclicos de <i>Strongylocentrotus pupuratus</i> ; |
| <b>HEK</b> , <i>human embrionic kidney</i> ;  | <b>μM</b> , micromolar.  |

**RESUMEN.**

El Speract, un decapeptido de la matriz extracelular del óvulo de erizo de mar de las especies *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*, aumenta los niveles de nucleótidos cíclicos y la permeabilidad iónica del espermatozoide. Estos cambios participan en la regulación de la motilidad de esta célula. De los canales que activa el Speract, los que tienen una especial importancia son los activados y/o modulados por nucleótidos cíclicos. El tamaño y morfología del espermatozoide ha dificultado el estudio directo de sus canales iónicos. En este trabajo se caracterizaron los canales iónicos que participan en la respuesta al Speract, realizando experimentos de *patch-clamp* directamente en espermatozoides hinchados de erizo de mar. En experimentos de *patch-clamp* en las configuraciones de parche escindido y de célula unida se observó que el GMPc o su análogo permeable a la membrana, el 8BrGMPc, son capaces de activar directamente un canal selectivo a  $K^+$  con una conductancia unitaria de 15 pS. Este canal se bloquea por 3,4-diclorobenzamil, un antagonista de canales modulados por nucleótidos cíclicos, así como por cationes divalentes. La activación directa de un canal de  $K^+$  por GMPc podría producir la hiperpolarización de la membrana plasmática del espermatozoide que se observa durante la respuesta al Speract. Adicionalmente, el dbAMPc, un análogo permeable del AMPc, y el IBMX, un inhibidor de fosfodiesterasas, modulan positivamente un canal catiónico que presenta dos subconductancias principales de 31 y 43 pS. Este canal es solamente 3 veces más selectivo a  $K^+$  que a  $Na^+$ . Asimismo, dado que el H7, un antagonista de fosfocinasas, mostró ser incapaz de inhibir la activación del canal por el dbAMPc, es probable que el AMPc active al canal directamente. La activación de este canal por AMPc en condiciones fisiológicas, donde la concentración de NaCl en el agua de mar es cercana a 0.5 M, permitiría que el  $Na^+$  entrara a la célula induciendo la repolarización y depolarización posteriores a la hiperpolarización inducida por el Speract. En experimentos de *patch clamp* se documentó que el Speract activa diferentes canales iónicos con conductancias cercanas a las de los canales modulados por nucleótidos cíclicos mencionados anteriormente. Tomadas en su conjunto, estas observaciones sugieren fuertemente que la unión del Speract a su receptor eleva los niveles de nucleótidos cíclicos, los cuales activan a su vez al menos a dos canales distintos en el espermatozoide del erizo de mar.

**SUMMARY.**

Ion channels are deeply involved in the sperm-egg dialogue in sea urchin and other species. Speract, a decapeptide from *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* sea urchin egg, increases the second messenger levels in sperm and induces changes in its ion membrane permeability. The size and particular morphology of sperm has made it difficult to study their ion channels and their direct modulation by second messengers. In this work, we characterize the ionic channels that participate in the Speract response using the patch clamp technique in swollen sea urchin sperm. From the various ion channels activated by Speract we are mainly interested in those modulated by cyclic nucleotides. In patch clamp experiments using the cell attached or the inside-out configurations, we observed that cGMP or a membrane permeable analog, 8BrcGMP, activates directly a 15 pS  $K^+$  selective channel. This channel is blocked by 3,4-dichlorobenzamil, a specific inhibitor for CNG channels, and by divalent cations. A direct activation of  $K^+$  channels by cGMP could be responsible for the sperm membrane hyperpolarization triggered by Speract. Additionally dbcAMP, a cAMP membrane permeable analog, and IBMX, a phosphodiesterases inhibitor, positively modulate a cation channel displaying two main subconductances of 31 and 43 pS. This channel is only 3 times more selective for  $K^+$  than for  $Na^+$ . Since H7, a generic protein kinase inhibitor, does not inhibit the activation by dbcAMP, the channel may be directly stimulated by cAMP. Under physiological conditions where NaCl in seawater is  $\sim 0.5$  M, the activation of this channel by cAMP would allow  $Na^+$  entry contributing to sperm membrane repolarization and depolarization after the hyperpolarization induced by Speract. Patch-clamp experiments revealed that Speract activates various ion channels whose conductances are similar to those of the cyclic nucleotide modulated channels mentioned earlier. These findings strongly suggest that indeed Speract binding to its receptor increases the levels of cyclic nucleotides and they activate at least two different sperm ion channels.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

La fecundación es un evento fundamental para la continuidad de las especies de reproducción sexual. El primer paso para que se lleve al cabo este proceso durante la reproducción sexual es el encuentro y la fusión del espermatozoide con su óvulo homólogo. El espermatozoide debe localizar al óvulo, penetrar la matriz extracelular y fusionarse con su membrana plasmática para así poder transferir su información genética y formar un nuevo individuo.

El erizo de mar ha servido como un modelo experimental sobresaliente para el estudio de la fecundación y el desarrollo temprano de los animales de reproducción sexual. Son muchas las cualidades experimentales por las que se le ha utilizado tan generalizadamente. Los erizos de mar son organismos marinos de reproducción sexual externa. Esto nos permite mantenerlos fácilmente en acuarios en donde reproducimos las condiciones ambientales a las que están adaptados. En su hábitat natural, los erizos de mar expulsan los gametos directamente al mar, lo que nos da la ventaja experimental de poder manipularlos en condiciones fisiológicas controladas, utilizando agua de mar artificial (AMA) preparada en el laboratorio.

El erizo de mar presenta sexos separados, haciendo posible el coleccionar de manera independiente la gran cantidad de gametos que producen. Un erizo macho maduro sexualmente produce alrededor de  $10^{10}$  espermatozoides y la hembra  $10^6$  óvulos durante la temporada de reproducción, proporcionando material biológico suficiente para la realización de experimento bioquímicos y fisiológicos.

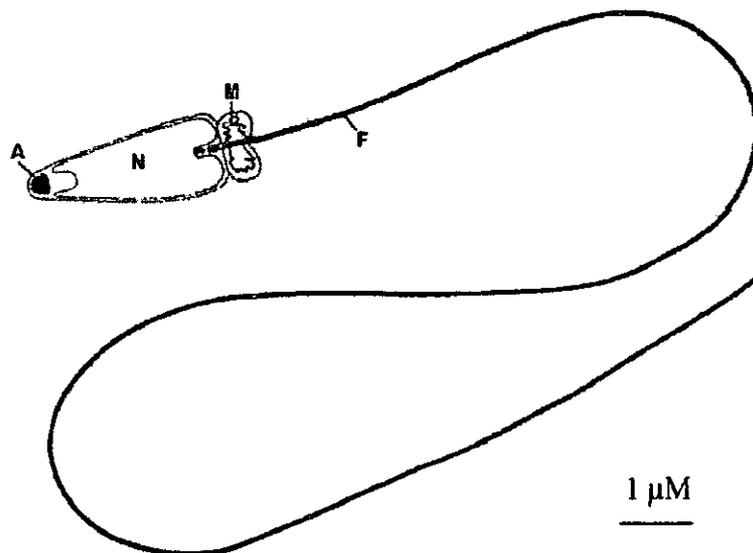
### A. El espermatozoide del erizo de mar.

Al final de la espermatogénesis, el espermatozoide se encuentra totalmente diferenciado y con una función específica, encontrar y fecundar al óvulo. El espermatozoide maduro es una de las células más pequeñas del organismo y presenta una morfología muy particular, básicamente esta formada por dos secciones, la cabeza y el flagelo. La cabeza tiene forma cónica y mide aproximadamente de 3 a 4  $\mu\text{m}$  de longitud por 2  $\mu\text{m}$  de ancho y contiene entre otras estructuras al núcleo haploide, cuya cromatina esta altamente condensada. El acrosoma se encuentra en la parte más frontal de la cabeza y contiene las enzimas líticas que eventualmente le permitirán al espermatozoide degradar las capas externas del óvulo y fecundarlo. El espermatozoide del erizo de mar contiene una mitocondria que se localiza en la base del flagelo, y que proporciona la energía necesaria para el movimiento del mismo. El flagelo mide aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro, esta formado por un complejo axonémico (axonema), que consta de un par de microtúbulos centrales rodeados de 9 pares de microtúbulos. El movimiento del flagelo impulsa al espermatozoide en su camino hacia el óvulo (Longo y Anderson, 1969, Darszon *et al*, 1999) (Figura. 1).

A partir de que los espermatozoides son eyaculados, comienza una serie de cambios fisiológicos que habilitan al espermatozoide para que pueda fecundar al óvulo. En el interior de la gónada los espermatozoides se encuentran inmóviles y con un bajo consumo de oxígeno. Esto se debe a la alta concentración de  $\text{CO}_2$  que mantiene el pH intracelular ( $\text{pHi}$ ) alrededor de 7.2. A este pH, la ATPasa que mueve al flagelo, llamada dineína, esta inactiva manteniendo al espermatozoide en un estado de baja actividad metabólica. Cuando los espermatozoides son vertidos al agua de mar, la concentración de  $\text{CO}_2$  disminuye y se liberan  $\text{H}^+$ . De esta forma,

aumenta el  $pH_i$  con lo cual se activa la dineína, y se produce ADP que incrementa la respiración aproximadamente 50 veces (Lee *et al*, 1983; Vacquier, 1986b).

Asimismo, los componentes de la capa externa del óvulo son capaces también de producir un aumento en la respiración y la movilidad del espermatozoide. Sin embargo, su papel más importante es el de inducir la reacción acrosomal, estos eventos son fundamentales para que se lleve al cabo la fecundación (Darszon *et al*, 1999). Además, en algunas especies se ha observado que ciertos componentes de la matriz extracelular del óvulo pueden funcionar como quimioattractantes para el espermatozoide (Darszon *et al*, 1999). En el caso de los erizos de mar esto sólo se ha demostrado para la especie *Arbacia punctulata* (Ward *et al*, 1985).



**Figura 1. Esquema del espermatozoide de erizo de mar.**  
A, acrosoma; N, núcleo; M, mitocóndria, F, flagelo (tomado de Vacquier, 1986a).

### **B. Respuesta del espermatozoide a los componentes de la matriz extracelular del óvulo.**

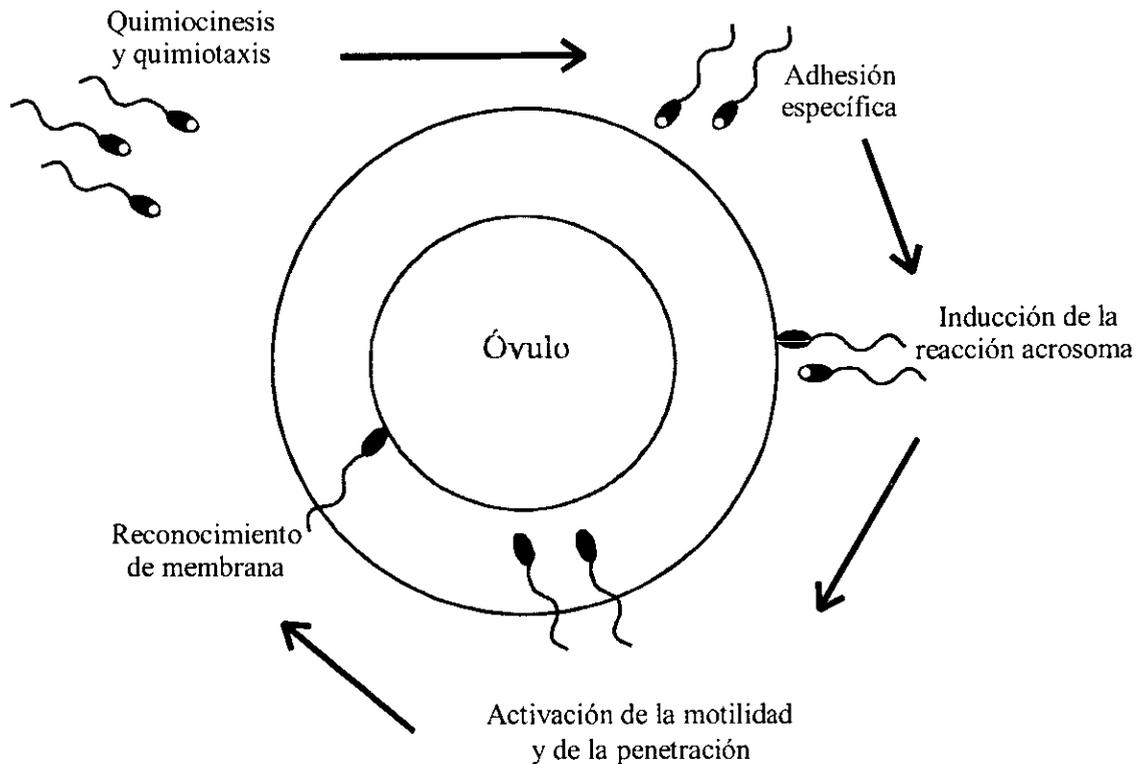
Los óvulos del erizo de mar están rodeados por una matriz extracelular, llamada gelatina. Esta capa externa está formada por un complejo de glicoproteínas cuya composición es

específica en cada especie. Entre sus constituyentes principales se encuentran un glicoconjugado de fucosa sulfatada (GFS), que es el factor inductor de la reacción acrosomal (Trimmer y Vacquier 1986) así como otros péptidos pequeños, conocidos en su conjunto como SAPs (por sus siglas en inglés *Sperm-Activating Peptides*) (Suzuki, 1995).

### **B.1. El Speract en la fisiología del espermatozoide.**

El primer SAP caracterizado fue llamado SAP-1, y actualmente es mejor conocido como Speract. Este es un decapeptido (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) que se encuentra en la gelatina de los óvulos de los erizos de mar del orden *Echinoidea* (Suzuki, 1995), al cual pertenecen, entre otras, las especies *Strongylocentrotus purpuratus* y *Lytechinus pictus*. Entre otras funciones, el Speract tiene la capacidad de estimular la respiración y la movilidad del espermatozoide a concentraciones de  $10^{-11}$  M (Dangott y Garbers 1984). Por otro lado, un péptido similar al Speract llamado resact de la especie *Arbacia punctulata*, se ha identificado como un agente quimiotáctico que a concentraciones nanomolares atrae a los espermatozoides de manera dependiente de  $Ca^{2+}$  (Ward, *et al.* 1985).

El efecto del Speract en el espermatozoide está mediado por receptores. Se ha reportado que el receptor al Speract es una glicoproteína de 77 kDa localizada en la membrana plasmática (Dangott y Garbers 1984; Dangott, *et al.* 1989). Utilizando un péptido fluorescente análogo al Speract se pudo localizar el receptor distribuido exclusivamente en la membrana del flagelo (Cardullo *et al.* 1994).



**Figura 2. Esquema de la interacción espermatozoide-óvulo en el erizo de mar.**

Se sabe además, que el receptor al Speract se encuentra asociado a la guanilato ciclasa de la membrana y que al unirse el Speract a su receptor, se activa transitoriamente la guanilato ciclasa, aumentando la concentración citoplasmática de GMPc (Garbers 1989). Pero eso no es todo, el Speract también altera la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide a ciertos iones. A concentraciones nanomolares estimula la entrada de  $^{22}\text{Na}^+$  y  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , la salida de  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$ , aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y el pH<sub>i</sub>.

Actualmente se piensa que al unirse el Speract a su receptor, se incrementa la concentración de GMPc intracelular ( $[\text{GMPc}]_i$ ), el cual produce la apertura de canales iónicos selectivos a  $\text{K}^+$  que hiperpolarizan a la célula (Lee y Garbers 1986, Babcock *et al.* 1992). Esta hiperpolarización activa un intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , alcalinizando el citoplasma, y el aumento en

el pHi inhibe a la guanilato ciclasa (Ward *et al.* 1986), explicando la activación transitoria de la guanilato ciclasa por el Speract.

Por otra parte, existen evidencias de la activación de canales iónicos directamente por nucleótidos cíclicos en diferentes tipos celulares (Kaupp, 1991, Yau, 1994). La activación de canales de  $K^+$  por GMPc podría deberse a la unión directa del nucleótido cíclico al canal o a la acción indirecta del canal vía fosforilación. Recientemente, se reportó evidencia que no es consistente con la participación de proteínas G y de proteínas cinasas en la activación de estos canales en el espermatozoide del erizo de mar, y que por el contrario apoya la idea de una activación directa por la unión del GMPc al canal (Galindo *et al.* 2000).

Se sabe asimismo que la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta en respuesta al Speract (Schackmann y Chock 1986). Existen evidencias de que el  $Ca^{2+}$  entra a la célula, al menos en parte, a través de canales de  $Ca^{2+}$  presentes en la membrana plasmática (Reynaud *et al.* 1993; Cook y Babcock 1993a, Beltrán *et al.* 1994). El  $Ca^{2+}$  podría ser un mediador importante del efecto de los péptidos del óvulo, especialmente en la quimiotaxis y los cambios en la motilidad del flagelo (Ward *et al.* 1986).

A concentraciones de Speract mayores a 100 pM la concentración de AMPc se incrementa debido a la activación de la adenilato ciclasa, enzima que en el espermatozoide del erizo de mar es modulada por el pHi, el potencial de membrana ( $E_m$ ) y el  $Ca^{2+}$  intracelular (Beltrán *et al.* 1996, Cook y Babcock 1993a, Garbers 1989). De manera interesante, todas estas variables se modifican durante la respuesta al Speract, lo cual explicaría la activación de esta enzima.

La presencia de canales de  $Ca^{2+}$  regulados por pH y/o AMPc (Babcock *et al.* 1992) y de un canal catiónico regulado por AMPc que permite el flujo de  $Na^+$  hacia el espermatozoide (Labarca *et al.* 1996), deben estar contribuyendo a la repolarización y subsecuente

depolarización que suceden después de la hiperpolarización inducida por el Speract.

## **B.2. La reacción acrosomal en el erizo de mar.**

La reacción acrosomal es un evento indispensable para que haya fecundación. Durante este evento se fusionan la membrana del gránulo acrosomal con la membrana plasmática, permitiendo la liberación de las enzimas líticas contenidas en el interior del acrosoma. Estas enzimas alteran la matriz extracelular del óvulo, permitiendo la entrada del espermatozoide hasta la membrana plasmática. Al mismo tiempo, la actina monomérica que se encuentra en la región periacrosomal se polimeriza, formando el túbulo acrosomal, se expone entonces a la superficie la proteína “adhesiva” con la cual se une el espermatozoide al óvulo (Ward y Kopf, 1993, Darszon *et al*, 1999).

La reacción acrosomal en el espermatozoide del erizo de mar ocurre en segundos y durante ésta ocurren varios eventos fisiológicos muy importantes. El glicoconjugado de fucosa sulfatada (GFS), conocido simplemente como “factor”, es el inductor fisiológico de la reacción acrosomal (Trimmer y Vacquier, 1986, Vacquier y Moy, 1997). El factor desencadena la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^+$  y  $\text{H}^+$ ; el movimiento de estos iones resulta en un incremento neto de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , un aumento en el  $\text{pH}_i$ , así como en la depolarización de la membrana (Darszon *et al*, 1988, Trimmer y Vacquier, 1986). Además de influenciar estos flujos iónicos, el GFS induce la activación de la adenilato ciclasa (aumentando el AMPc), de proteínas cinasas (Ward y Kopf, 1983) y estimula el recambio de fosfoinosítidos y la actividad de la fosfolipasa D (Domino y Garbers, 1988). Todos estos eventos dependen de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Asimismo, para que ocurra la reacción acrosomal se requiere de un incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en el espermatozoide (Ward y Kopf, 1993) que también depende de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Guerrero y Darszon,

1989a, 1989b).

### **C. Canales iónicos.**

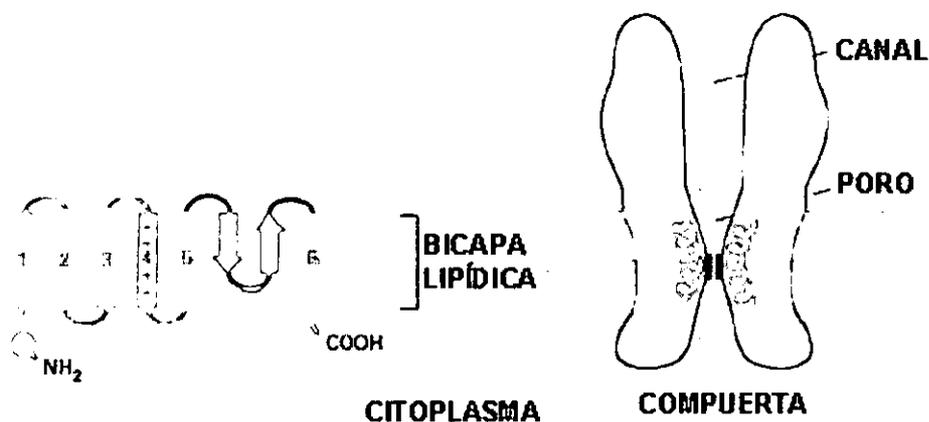
Los canales iónicos son proteínas integrales de la membrana plasmática que tienen por función el transporte de iones a través de la misma. Esto es posible debido a que los canales forman un poro acuoso a través del cual los iones pueden pasar de un lado a otro de la membrana. Aunque existen diferentes familias de canales iónicos, por el análisis de la secuencia primaria sabemos que básicamente todos los canales iónicos están conformados por regiones hidrofóbicas e hidrofílicas. Las regiones hidrofóbicas, son segmentos de aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, distancia suficiente para atravesar la membrana por completo. También existe una región hidrofóbica especializada que forma el poro por el cual fluyen los iones. Las regiones hidrofílicas unen a las regiones hidrofóbicas formando asas que se encuentran suspendidas en el citoplasma o en el medio extracelular. Además de las regiones mencionadas, dependiendo de cada canal iónico en específico, se puede destacar también la presencia de filtros de selectividad, del sensor de voltaje, de compuertas de apertura-cierre y de inactivación, de regiones consenso de modulación por segundos mensajeros y de otros sitios específicos de unión a agonistas y/o antagonistas del canal.

Los canales iónicos son en realidad complejos oligoméricos formados por la asociación de diversas proteínas o subunidades intrínsecas al complejo del canal, y son capaces de asociarse con otras proteínas extrínsecas que participan en su regulación. Funcionalmente, los canales iónicos se distinguen unos de otros por diferencias en su selectividad iónica, permeabilidad, conductancia, cinética y modulación. Su clasificación básica se establece en términos de su selectividad, es decir en la especie iónica que permea fundamentalmente a través del canal en

condiciones fisiológicas. Así, los canales se clasifican como canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$ , sin embargo cuando su selectividad es pobre, se conocen simplemente como canales catiónicos o aniónicos. Esta característica de selectividad la proporciona el filtro de selectividad, que generalmente, es la porción mas angosta del canal y que por cuestión de tamaño y fuerzas electrostáticas selecciona a la especie iónica permeante.

La activación de los canales puede deberse a la acción de compuestos químicos o por factores físicos. Así, de acuerdo con la forma en que los canales se activan, estas proteínas pueden clasificarse en canales activados por ligando (extra o intracelulares), canales activados por voltaje y canales activados por estímulos físicos (por estrés mecánico u osmótico y por calor).

En la Figura 3 se muestra el esquema general de un canal de  $\text{K}^+$  voltaje dependiente, donde se pueden observar los diferentes dominios que conforman una subunidad del canal iónico.



**Figura 3. Esquema de la subunidad  $\alpha$  de un canal de  $\text{K}^+$  dependiente de voltaje.** En verde y numerados del 1 al 6 se muestran los segmentos transmembranales, en rojo se representa el asa entre los segmentos 5 y 6 que forma el poro del canal y en azul se resalta el segmento S4 donde se encuentra una serie de aminoácidos cargados positivamente y que forma parte del sensor de voltaje (modificado de Alberts *et al.*).

### **C.1. Canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar.**

Tal y como lo hemos venido discutiendo, los flujos iónicos son parte central de la comunicación entre el espermatozoide y el óvulo, participan en la activación de la respiración y la movilidad, así como de la reacción acrosomal y por tanto de la fecundación. De esta manera, resulta evidente que la caracterización de los canales iónicos y de las vías de señalización intracelular que activan o modulan a estos canales en respuesta a agentes fisiológicos como el Spermact es de suma importancia para entender con más detalle aspectos importantes en la biología de la reproducción. El conocer al nivel molecular la fisiología del espermatozoide y su interacción con el óvulo, podría permitir en el futuro, entre otras cosas, el desarrollo de métodos para controlar la fecundación dirigidos al hombre y quizá, encontrar la respuesta a algunos de los problemas de infertilidad.

En años recientes se han utilizado diferentes estrategias experimentales para tratar de conocer que canales iónicos están presentes en la membrana del espermatozoide y comprender como estos sistemas de transporte iónico participan en el proceso de comunicación entre los gametos. Utilizando distintos compuestos fluorescentes se ha podido medir en poblaciones de espermatozoides los cambios en el  $pH_i$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  y el  $E_m$  en respuesta a los componentes de las capas externas del óvulo. Por otro lado, el estudio y caracterización de los canales iónicos directamente en el espermatozoide ha sido una tarea complicada. Esto se debe a que el espermatozoide es una de las células más pequeñas de los organismos ( $\sim 1.5 \mu m$  diámetro de la cabeza) y se distingue por su morfología especializada para desplazarse hacia el óvulo.

Al poder disponer de una gran cantidad de espermatozoides, es posible aislar y caracterizar fracciones de membrana plasmática provenientes de diferentes regiones de la célula.

Reincorporando vesículas de membrana plasmática en bicapas lipídicas artificiales se ha logrado estudiar los canales iónicos presentes en ellas, así se han caracterizado diferentes canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar. El primer registro de canal unitario de espermatozoides de erizo de mar se obtuvo en experimentos de bicapas hechas en la punta de una micropipeta utilizando vesículas de membrana de flagelo del espermatozoide, lográndose registrar un canal catiónico con una conductancia unitaria de 82 pS y dos canales selectivos a  $K^+$ , de 22 y 46 pS (Liévano *et al.* 1985). Siguiendo la estrategia experimental de fusión de vesículas de membrana plasmática a bicapas lipídicas planas, se caracterizaron además un canal de  $Ca^{2+}$  voltaje dependiente de 172 pS (Liévano *et al.* 1990), un canal aniónico de 148 pS (Morales *et al.*, 1993), y un canal de selectivo a  $K^+$  de 103 pS modulado por AMPc (Labarca *et al.* 1996).

Aunque de los experimentos en bicapas planas se ha obtenido información muy valiosa acerca de los canales iónicos del espermatozoide, este es un modelo experimental que tiene diferencias importantes con la situación fisiológica. Por esta razón es importante también caracterizar los canales iónicos directamente en el espermatozoide y estudiar su regulación “*in situ*”. Sin embargo, el tamaño y la morfología del espermatozoide son las dos principales dificultades que se presentan para la aplicación de las técnicas típicas utilizadas en electrofisiología. Aún con estas dificultades, en nuestro laboratorio se ha logrado realizar experimentos de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) directamente en espermatozoides intactos. Desafortunadamente, el éxito de estos experimentos es muy limitado (Guerrero *et al.* 1987), y solamente se ha podido registrar en la configuración de célula unida. En estas condiciones se han identificado y caracterizado únicamente dos canales de  $K^+$  con conductancias de 60 y 172 pS.

Para incrementar el éxito en los experimentos de *patch-clamp* directamente en el espermatozoide de erizo de mar, aprovechamos la estrategia experimental de hinchar las células con un choque osmótico. Al resuspender los espermatozoides en agua de mar diluida 10 veces, el axonema del flagelo se internaliza y la célula se vuelve prácticamente esférica, con un diámetro aproximado de 4  $\mu\text{m}$ . Esta estrategia aumenta grandemente la probabilidad de formar sellos de alta resistencia eléctrica de un 6 al 35 % (Darzson *et al.* 1994). La evidencia experimental disponible indica claramente que los espermatozoides hinchados mantienen su integridad membranal ya que responden al Speract con cambios de  $E_m$ ,  $\text{pHi}$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  parecidos, en términos generales, a los que se presentan en los espermatozoides no hinchados (Reynaud *et al.*, 1993). De esta forma en los espermatozoides hinchados, concentraciones picomolares de Speract provocan un aumento en la permeabilidad al  $\text{K}^+$  mediada por canales de  $\text{K}^+$  como lo indican experimentos de *patch-clamp*. En estos experimentos se logró la detección de un canal de  $\text{K}^+$  con una conductancia de 5 pS, que se activa al exponer a la célula hinchada al Speract (Babcock *et al.*, 1992). A concentraciones mayores a 25 pM, la célula se hiperpolariza de manera transitoria a un potencial cercano al potencial de equilibrio del  $\text{K}^+$ , para repolarizarse inmediatamente después a un potencial alrededor del potencial de reposo. Esta hiperpolarización parece activar el intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Experimentos de sustitución iónica indican que la permeabilidad al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  contribuyen al potencial de reposo de los espermatozoides hinchados (Reynaud *et al.*, 1993).

## **C.2. Canales activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos.**

Recientemente se reportó la clonación por primera vez de un canal iónico presente en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar

este canal se le llamó SPIH y su secuencia de aminoácidos comparte similitudes con la de los canales activados por nucleótidos cíclicos y los canales de  $K^+$  voltaje dependiente (Gauss *et al*, 1998). Considerando sus características, este canal se ha clasificado dentro de una nueva familia de canales iónicos que se pueden activar por hiperpolarización y por nucleótidos cíclicos (canales HCN, por sus siglas en inglés: Hiperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels) (Kaupp y Seifert, 2001).

El marcapasos del corazón se observa como una descarga rítmica en el nodo sino-atrial. La frecuencia de disparos de potenciales de acción en estas células esta determinada por una corriente específica que depolariza lentamente la membrana hasta un potencial umbral, que superándolo se desencadena un potencial de acción (Idelson, 2001). Los canales HCN son los responsables de generar esta corriente en las células marcapaso del corazón (DiFrancesco, 1993, Pape, 1996) la cual se conoce como  $I_h$  (h por hiperpolarización) y cuya presencia también se ha observado su presencia en algunos tipos neuronales (DiFrancesco, 1993, Pape, 1996, Santoro *et al*, 1998, Ludwig *et al*, 1998, Ishii *et al*, 1999). Las características que hacen única a esta corriente son que se activa por hiperpolarización, conduce tanto  $Na^+$  como  $K^+$ , se bloquea por  $Cs^+$  extracelular y se incrementa por el AMPc, cuando este nucleótido actúa directamente sobre los canales HCN (Biel *et al*, 1999).

A la fecha se han identificado y caracterizado cuatro genes que codifican para los canales HCN en mamíferos (HCN1, HCN2, HCN3 y HCN4). Estos genes se expresan principalmente en el cerebro y el corazón, aunque también se han encontrado sus productos en el pulmón, testículo, músculo esquelético, hígado y riñón (Kaupp y Seifert, 2001). Por otro lado, como se mencionó anteriormente, también existe un gene que codifica para un canal HCN, (SPIH, ahora SpHCN; Gauss *et al*, 1998) que fue originalmente clonado a partir del testículo del erizo

de mar de la especie *S. purpuratus*. Adicionalmente se han detectado algunos genes que codifican para canales tipo HCN en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (DmHCN) (Marz *et al*, 1999) y en el gusano de seda *Heliothes viscerens* (HvHCN) (Krieger *et al*, 1999). La secuencia de aminoácidos de los canales HCN presenta similitudes con la de los canales de  $K^+$  voltaje dependientes y los canales CNG. Esta conserva los dominios característicos principales de los canales voltaje dependientes, como son, los seis segmentos transmembranales (S1-S6), incluyendo el dominio S4 que forma parte del sensor de voltaje, la región del poro entre los segmentos S5 y S6, y en el extremo carboxilo citoplasmático presenta un dominio de unión a nucleótidos cíclicos similar al de los canales activados por nucleótidos cíclicos (Kaupp y Seifert, 2001).

La expresión funcional de SpHCN en células HEK-293 da lugar a un canal activado por hiperpolarización pobremente selectivo a  $K^+$ . Las características más sobresalientes de este canal son que se activa con hiperpolarizaciones de la membrana plasmática observándose una activación rápida y una inactivación. El SpHCN se modula directamente por AMPc pero muy pobremente por GMPc. El AMPc produce un aumento en la corriente total y la pérdida de la inactivación. La secuencia de selectividad a cationes monovalentes del canal es  $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ ; presenta una razón de permeabilidad de  $P_K/P_{Na} \sim 5$  y se bloquea por  $Cs^+$  en la solución extracelular con una  $IC_{50}$  de 245  $\mu M$  (Gauss *et al*, 1998). Por lo descrito anteriormente, el canal SpHCN se asemeja al canal de  $K^+$  regulado por AMPc descrito por Labarca *et al* (1996) presente en la membrana del espermatozoide del erizo de mar. Este canal fue caracterizado en bicapas planas a partir de membranas de flagelo, tiene una conductancia unitaria de 103 pS, presenta baja probabilidad de apertura y una débil dependencia al voltaje. La adición de AMPc incrementa su probabilidad de apertura de manera dosis dependiente ( $K_d$

~ 214  $\mu\text{M}$ ) y se bloquea de manera voltaje dependiente por  $\text{Ba}^{2+}$  o por  $\text{TEA}^+$  a concentraciones milimolares. Por último, el canal muestra una relación de permeabilidad de  $P_{\text{K}}/P_{\text{Na}} \sim 5$  indicando que es poco selectivo entre  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  (Labarca *et al*, 1996).

### **C.3. Canales activados por nucleótidos cíclicos.**

Durante la respuesta al Speract la concentración de nucleótidos cíclicos aumenta, participando de manera directa en la transducción de señales intracelulares en esta respuesta. De esta manera, la unión del Speract a su receptor activa transitoriamente a la guanilato ciclasa, aumentando la  $[\text{GMPc}]_i$  y produciéndose una hiperpolarización. Se ha propuesto que esta hiperpolarización se debe a la activación de canales altamente selectivos a  $\text{K}^+$  modulados directamente por el GMPc (Galindo *et al*, 2000).

La activación directa de canales iónicos por nucleótidos cíclicos se observó por primera vez en los conos y bastones de la retina (Kaupp *et al*, 1989), donde los canales son parte esencial de la vía de transducción de señales que convierte la luz absorbida en estímulos eléctricos (Kaupp, 1995, Zimmerman, 1995). En los fotorreceptores estos canales se activan fisiológicamente por la unión directa de GMPc (Kaupp, 1995, Zimmerman, 1995). En cambio, en las neuronas sensoriales olfatorias existen canales similares que se activan, en condiciones fisiológicas, por AMPc y participan en la transducción sensorial de los olores (Kaupp, 1995, Zimmerman, 1995, Nakamura, 2000). Esta clase de canales, además de encontrarse en los fotorreceptores y neuronas olfatorias, se ha localizado en células de otros tejidos como el nervioso (células bipolares y células ganglionares), el riñón, la glándula pineal, el corazón, la aorta y los espermatozoides (Kaupp, 1995).

Al nivel molecular, los canales activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG, por sus

siglas en inglés: Cyclic Nucleotide Gated channels) se conforman por la combinación de dos diferentes subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) arregladas en una estructura tetramérica con una estequiometría no determinada hasta el momento (Zagotta y Siegelbaum 1996). De la subunidad  $\alpha$ , se han clonado 4 diferentes miembros llamados CNC $\alpha$ 1- $\alpha$ 4 mientras que de la subunidad  $\beta$ , se sabe que existen dos formas producidas por procesamiento alternativo (la CNC $\beta$ 1A y la CNC $\beta$ 1B; Bönigk *et al*, 1999). La subunidad  $\alpha$  por sí sola puede formar canales funcionales al expresarse heterológamente. Sin embargo, la subunidad  $\beta$  no produce canales funcionales por sí misma, si no que confiere propiedades específicas como la susceptibilidad al bloqueo por L-cis-diltiazem, un antagonista específico de los canales CNG, la activación en forma fluctuante, conocida como “flickering” (Chen *et al*, 1993) y la modulación por Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (Hsu y Molday 1993, Chen *et al*, 1994), propiedades que se observan normalmente en los canales nativos de los fotorreceptores y neuronas olfatorias (Zimmerman, 1995).

Los canales CNG son estructuralmente homólogos a los canales dependientes de voltaje. La subunidad  $\alpha$  presenta seis segmentos transmembranales y una asa entre el segmento S5 y S6 que forma parte del poro. Estos incluyen también el segmento S4 conformado por aminoácidos cargados positivamente que forma parte del sensor de voltaje. Sin embargo, inesperadamente se ha reportado que los canales CNG solo presentan una débil dependencia al voltaje (Broillet y Firestein, 1999). En contraste, dichos canales se abren por la unión del GMPc o AMPc a un dominio de unión de nucleótidos cíclicos específico que se localiza en el extremo carboxilo citoplasmático (Kaupp 1995, Zimmerman, 1995, Broillet y Firestein, 1999). La expresión funcional de los canales CNG en sistemas heterólogos produce canales iónicos

selectivos a  $K^+$  o poco selectivos a cationes. La activación de este tipo de canales puede producir diferentes cambios en el Em de la célula, ya sea que se depolarice o se hiperpolarice (Finn *et al*, 1997) y/o que permita la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula (Kaupp, 1995).

En el espermatozoide de mamífero también se han localizado canales CNG. Utilizando testículos de toro se clonaron una subunidad  $\alpha$  y varias isoformas de la subunidad  $\beta$  de canales CNG (Wiesner *et al*, 1998, Weyand *et al*, 1994). La subunidad  $\alpha$  del testículo presenta una alta similitud a la clonada de los fotorreceptores (78% de los residuos son idénticos; Weyand *et al*, 1994). Tanto la subunidad  $\alpha$  como las diferentes isoformas de la subunidad  $\beta$  se localizan en el flagelo del espermatozoide y presentan una distribución diferencial a lo largo del flagelo, lo que sugiere que canales CNG de diferentes conformaciones coexisten en el espermatozoide (Wiesner *et al*, 1998). Se ha reportado que estos canales sirven como una vía de entrada de  $Ca^{2+}$  que responde de manera más sensible a GMPc que a AMPc, aunque aun no se ha determinado con precisión cual podría ser su papel fisiológico durante la fecundación (Wiesner *et al*, 1998).

En el erizo de mar, por su parte, se ha propuesto que el canal que se activa por el aumento de GMPc y que produce una hiperpolarización en respuesta al Speract, podría ser similar al canal CNG que se localizó y caracterizó en los fotorreceptores ciliares de moluscos bivalvos de la especie *Pecten irradians* (Gómez y Nasi, 1995). Este canal es altamente selectivo a  $K^+$  y se activa directamente por GMPc, participando en la hiperpolarización del fotorreceptor en respuesta a la estimulación por luz (Gómez y Nasi, 1995).

## II. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo fue la caracterización de los canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar que participan en la respuesta al Speract, utilizando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) y el estudio de la regulación de estos canales.

Para cumplir el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- a) Realizar registros electrofisiológicos de canales iónicos directamente en espermatozoides hinchados de erizos de mar.
- b) Caracterizar los canales del espermatozoide que participan en la respuesta al Speract.
- c) Determinar las vías de transducción de señales intracelulares que modulan los canales iónicos que participan en la respuesta al Speract.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **A. Material Biológico.**

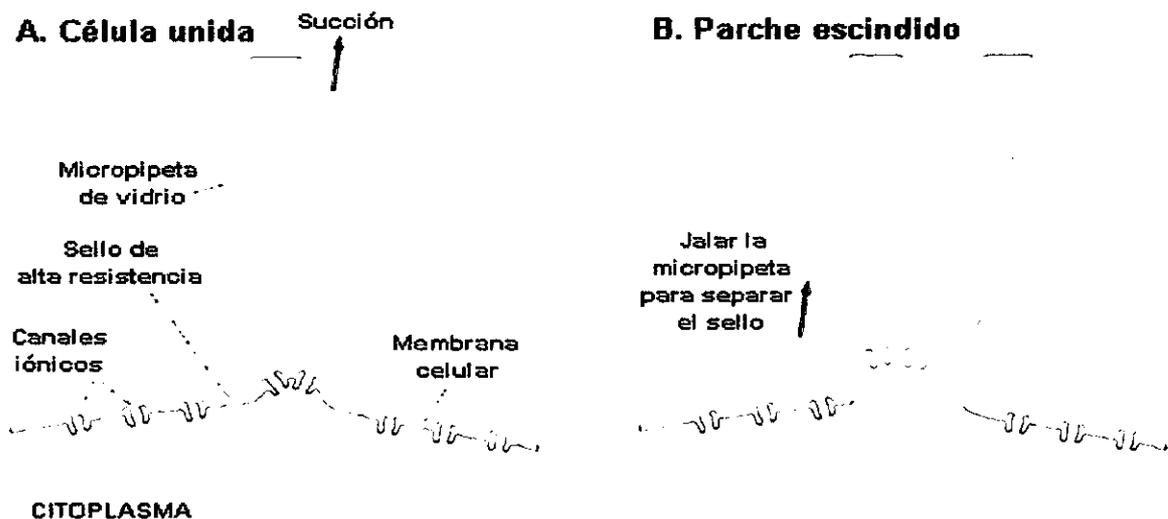
Para los experimentos descritos en este trabajo de tesis se utilizaron erizos de mar de las especies *S. purpuratus* y *L. pictus*, colectados en las costas del sur de California en Estados Unidos o de Ensenada, Baja California en México. La eyaculación en los erizos se indujo mediante la inyección intracelómica de KCl 0.5 M. Los espermatozoides se colectaron en seco (sin diluir) con una pipeta Pasteur y se mantuvieron en hielo. Posteriormente, las células se suspendieron en una dilución 1:60 con agua de mar que contiene (en mM): NaCl 486, KCl 10, MgCl<sub>2</sub> 26, MgSO<sub>4</sub> 30, CaCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 2.5, EDTA 0.1, HEPES 10, pH 7 y 955 mOsm. Los espermatozoides se hincharon al resuspenderlos en agua de mar diluida 10 veces (AMD1:10) cuya composición (en mM) fue: NaCl 49, KCl 1, MgCl<sub>2</sub> 25, CaCl<sub>2</sub> 1, EDTA 0.1, HEPES 10, pH 7 y 155 mOsm.

#### **B. Electrofisiología.**

Para caracterizar los canales iónicos presentes en la membrana del espermatozoide se utilizó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana, conocida como *patch-clamp*, de acuerdo a los métodos descritos por Sakmann y Neher (1983). Como se mencionó con anterioridad, es muy difícil y laborioso realizar experimentos de *patch-clamp* directamente en el espermatozoide. Para aumentar el éxito en la formación de sellos de alta resistencia eléctrica (gigasellos), en el laboratorio se implementó la técnica de *patch-clamp* utilizando espermatozoides hinchados. Para los registros se usaron las configuraciones de célula unida y de parche escindido, lo que permitió examinar a los canales iónicos directamente en el

espermatozoide y brindó la posibilidad de caracterizar su participación en la respuesta al Speract y a otros componentes de las vías de señalización que participan en esta respuesta fisiológica.

La técnica consiste en formar un sello eléctrico de alta resistencia entre la punta de una micropipeta de vidrio y la membrana plasmática de la célula, aislando una pequeña área (parche) de la membrana. La micropipeta se llena con una solución iónica cuya es determinada por el investigador y en ella se sumerge un electrodo de cloruro de plata conectado a un amplificador operacional, con el que se registran las corrientes iónicas que fluyen a través de los canales iónicos presentes en el parche (Figura 4).



**Figura 4. Técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*).** Esquema de la formación de sellos de alta resistencia eléctrica entre la punta de la micropipeta de vidrio y la membrana plasmática en la técnica de *patch clamp*.

En los experimentos de *patch-clamp* descritos a continuación se utilizaron micropipetas de vidrio cuya resistencia eléctrica fue de 25-65 M $\Omega$  una vez llenas con la solución de registro. Como solución externa (baño) se utilizó AMD1:10, mientras que en la pipeta se emplearon

diferentes soluciones de acuerdo a los experimentos por realizar. En los experimentos donde se probó el efecto del Speract se utilizaron soluciones con diferente composición iónica (véase Tabla I). En los experimentos donde se probó el efecto del GMPc y del AMPc se utilizaron dos soluciones diferentes, una denominada P150K que contenía (en mM): 150 KCl, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7, y otra denominada P100K50Na que contenía (en mM): 100 KCl, 50 NaCl 5 EGTA, 10 HEPES y pH 7. En los experimentos de parches escindidos se utilizó la solución P100K50Na en la pipeta y la solución del baño se substituyó por una solución que contenía (en mM): 140 KCl, 10 NaCl, 5 EGTA, 10 HEPES, pH 7

La actividad de canales unitarios en los parches se registró utilizando un amplificador Axopatch-200A. Los registros se digitalizaron en línea con un convertidor analógico-digital Digidata-1200 a una frecuencia de muestreo de 5 kHz y filtrado en línea a una frecuencia de 2 kHz. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 18-20°C.

Los nucleótidos cíclicos y demás compuestos para el estudio de los canales iónicos se perfundieron directamente cambiando la solución del baño.

### **C. Análisis de los datos electrofisiológicos.**

Para el análisis de las corrientes iónicas a través de los canales unitarios, los registros se filtraron a 350 ó 500 Hz y se analizaron utilizando las rutinas de análisis Fetchan y Pstat incluidas en el programa pClamp V6.0.4 de Axon Instruments. Los ajustes matemáticos de las curvas y distribuciones se realizaron usando el método de mínimos cuadrados usando el programa PSI-Plot V4.53.

El potencial aplicado en la pipeta en los experimentos en la configuración de célula unida, se corrigió a un potencial de membrana calculado de acuerdo a la convención utilizada en la

técnica de *patch-clamp* (Hille, 1984). En esta, la relación entre el potencial aplicado ( $E_{\text{aplicado}}$ ) y el potencial de membrana ( $E_m$ ) es:

$$E_m = EMR - E_{\text{aplicado}},$$

donde EMR es el potencial de membrana en el reposo. Para los estudios que aquí se presentan se utilizó el potencial de membrana reportado para poblaciones de espermatozoides hinchados, medido con compuestos fluorescentes sensibles a potencial, que corresponde a  $-50$  mV (Reynaud *et al.*, 1993).

La razón de permeabilidad relativa ( $P_K/P_{Na}$ ) se calculó utilizando el valor del potencial de inversión ( $E_{\text{rev}}$ ) en experimentos en condiciones biológicas de acuerdo a la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz (Hille, 1992):

$$\frac{P_{K^+}}{P_{Na^+}} = \frac{[Na^+]_i \exp^{(zFV_{\text{rev}}/RT)} - [Na^+]_o}{[K^+]_o - [K^+]_i \exp^{(zFV_{\text{rev}}/RT)}}$$

donde,  $z$  es la valencia del ión,  $F$  es la constante de Faraday,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura en grados Kelvin.

Los ajustes matemáticos de las curvas y distribuciones se realizaron usando el método de mínimos cuadrados usando el programa PSI-Plot V4.53.

Como más adelante se menciona, en algunos experimentos en los cuales se utilizó GMPc, fue necesario realizar un análisis de ruido de la corriente iónica activada por este compuesto en presencia de cationes divalentes. Al activarse varios canales iónicos a la vez, la señal registrada corresponde a la suma de las corrientes que fluyen a través de cada uno de los canales. Las fluctuaciones rectangulares características de los canales unitarios no son evidentes en estas señales. En lugar de ello, la señal parece tener solamente un ruido aleatorio sobrepuesto en ella. El análisis de ruido eléctrico se utiliza para obtener información de las

características biofísicas de los canales iónicos que dan lugar a este tipo de señales, ya que la conductancia unitaria de estos canales no se puede resolver adecuadamente con las técnicas convencionales. De esta manera, se llevaron a cabo dos diferentes análisis, uno de varianza de la corriente que permitió determinar la amplitud de la corriente y la conductancia unitaria de los canales registrados; y un análisis espectral de frecuencias de la varianza de la corriente que permitió determinar los parámetros cinéticos de los canales. Ambos análisis se realizaron de acuerdo al método descrito por Dempster (1993) y que se menciona brevemente a continuación.

El análisis de varianza de la corriente es esencialmente una forma de análisis de amplitud, donde a partir de la relación entre la corriente promedio y la varianza de las fluctuaciones de la corriente se puede obtener información de la magnitud de la corriente que pasa a través de un solo canal. Para una célula que contiene una población de canales iónicos ( $n$ ), cada uno capaz de conducir una corriente ( $i$ ), la corriente promedio en el estado estacionario ( $I$ ), esta dada por la ecuación:

$$I = i n p$$

donde  $p$  es la probabilidad de que el canal se abra en un tiempo dado. La varianza de las fluctuaciones de la corriente alrededor de esta corriente promedio ( $\sigma^2$ ) está dada por:

$$\sigma^2 = i^2 n p (1-p).$$

Las dos ecuaciones anteriores se pueden combinar para obtener la relación entre  $\sigma^2$  e  $I$  obteniéndose:

$$\sigma^2 = i I (I/n)$$

Si la probabilidad de apertura es muy pequeña ( $p < 0.1$ ), el segundo término de esta

ecuación se puede menospreciar, obteniéndose la ecuación lineal:

$$\sigma^2 = i I$$

donde la varianza es directamente proporcional a la corriente promedio. La corriente unitaria puede calcularse como la razón de la varianza entre la corriente promedio.

La conductancia unitaria ( $\gamma$ ) se puede calcular de:

$$\gamma = \frac{\sigma^2}{I(V_m - V_r)}$$

donde  $V_m$  es el potencial de membrana de la célula y  $V_r$  es el potencial de inversión de la corriente que fluye a través del canal.

La duración promedio de los eventos de apertura y cierre de los canales influencia la frecuencia de las fluctuaciones de la corriente, por esto la distribución de frecuencias dentro de la varianza de la corriente contiene información de la cinética de los canales.

Una estimación de la distribución de frecuencias dentro de la varianza del ruido se puede obtener del espectro de fuerzas, el cual se calculó utilizando el algoritmo de la transformada rápida de Fourier que, básicamente, calcula la frecuencia de los componentes que conforman una señal eléctrica.

$$S(f) = \frac{S(0)}{1 + (f/f_c)^2}$$

El espectro de fuerza de las fluctuaciones de una corriente, producida por canales iónicos con tiempos de permanencia exponenciales, se puede representar por la suma de una o varias funciones Lorentzianas, que tiene el espectro de frecuencias:

A frecuencias bajas la función tiende a un valor constante,  $S(0)$ , mientras que a frecuencias altas el espectro decae en proporción a  $1/f^2$ . Las constantes de tiempo de apertura y cierre del

canal determinan la frecuencia de corte,  $f_c$ , a la cual la fuerza decae a la mitad.

La constante de tiempo característica ( $\tau$ ) es una función de dos constantes cinéticas, la constante del estado abierto ( $\tau_o$ ) y la constante del estado cerrado ( $\tau_c$ ).

$$\tau = \frac{1}{2\pi f_c} = \frac{1}{1\tau_o} + \frac{1}{1\tau_c}$$

#### **D. Experimentos de inmunocitoquímica.**

Los espermatozoides se fijaron utilizando paraformaldehído al 4% (en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4). La inmunotinción del canal SpHCN en espermatozoides de *L. pictus* se realizó con el anticuerpo policlonal FPc44K específico contra este canal (donación del Dr. Benjamin Kaupp; Gauss *et al*, 1998), purificado del suero de conejo inmunizados, a una dilución 1:2000. La unión del anticuerpo se reveló con un anticuerpo secundario Alexa 594 de Molecular Probes en una dilución 1:100. La inmunolocalización del canal se observó utilizando microscopía confocal. La presencia de la señal específica se corroboró mediante controles específicos utilizando solamente el anticuerpo secundario y controles positivos con espermatozoides de *S. purpuratus*, en los cuales se reportó originalmente la presencia de este canal (Gauss *et al*, 1998).

#### IV. RESULTADOS.

##### A. Registro electrofisiológico de los canales iónicos de espermatozoides hinchados.

Debido a la tan peculiar morfología y al diminuto tamaño del espermatozoide, realizar experimentos de *patch-clamp* directamente en estas células ha sido una tarea muy difícil. Estudios iniciales muestran que cuando intentaron realizar registros de *patch-clamp* utilizando espermatozoides intactos de erizo de mar, sólo se tuvo éxito en aproximadamente un 3% de los intentos por formar gigasellos (Guerrero *et al*, 1986). De igual manera, cuando se usaron únicamente las cabezas de los espermatozoides, sólo se obtuvo un 6.7% de éxito y únicamente el 30% de estos sellos presentaban actividad de canales iónicos (Guerrero *et al*, 1986). Algo similar sucedió cuando se utilizaron espermatozoides de ratón; en donde se ha reportado ~7% de éxito en la formación de sellos de alta resistencia eléctrica (Espinosa *et al*, 1999).

Durante la realización de este trabajo se logró demostrar que el empleo de espermatozoides hinchados de erizo de mar es una buena alternativa para aumentar el éxito en la formación de gigasellos. Cuando hinchamos los espermatozoides utilizando agua de mar diluida 10 veces, las células pierden su morfología característica, volviéndose pequeñas esferas de aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  de diámetro (ver Figura 17 panel C y D). El éxito en la formación de los sellos aumenta a un 33.5% (789 parches de 2356 intentos) cuando se emplean las células hinchadas, observándose actividad de canales iónicos en ~37 % de los casos.

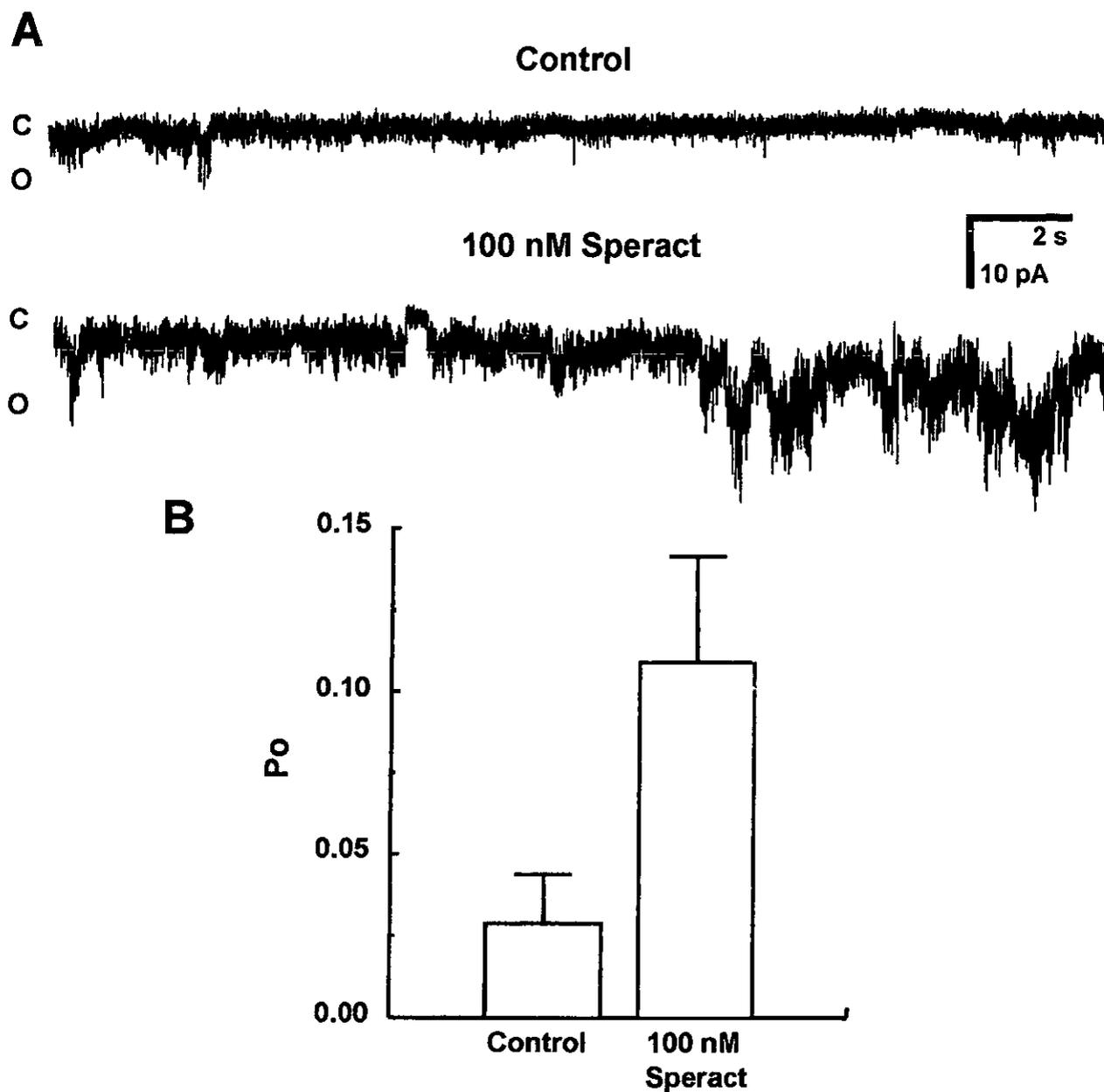
En general, utilizando la configuración de célula unida (*on cell patch*), se logró registrar corrientes unitarias con la frecuencia antes señalada. En contraste, en muy poco casos (17 parches) se consiguió tener parches escindidos en la configuración de parche con el interior

hacia afuera (*inside-out*), y menos aún, en nuestras condiciones experimentales fue imposible formar parches con el exterior hacia fuera (*outside-out*) a partir de la configuración de célula completa (*whole cell*).

### **B. Activación de canales iónicos del espermatozoide por el Speract.**

Como una aproximación inicial para tratar de determinar que canales iónicos se activaban por la unión del Speract a su receptor se hicieron experimentos en los que se perfundió directamente el decapeptido sobre el espermatozoide en el cual se había establecido el gigasello. En 6 de 14 experimentos en los cuales se añadió 100 nM Speract, fue posible observar la activación de diversas conductancias. En la Figura 5A se muestra un registro representativo donde se observa la actividad de los canales iónicos en un parche antes y después de la perfusión con 100 nM Speract. La adición del Speract produce la activación de múltiples conductancias, haciendo difícil determinar que tipo de canales se activaron. Sin embargo, calculando la probabilidad de apertura promedio del registro ( $P_o$ ) antes y después de la adición del Speract, donde se incluye la  $P_o$  de todos los niveles de conductancia presentes, se observa que el decapeptido induce un incremento en la  $P_o$  general de  $5.5 \pm 1.9$  veces con respecto al control, aumentando de  $2.87 \pm 1.5$  % en los registros control a  $10.9 \pm 3.3$  % en los registros en presencia del Speract (Figura 5B).

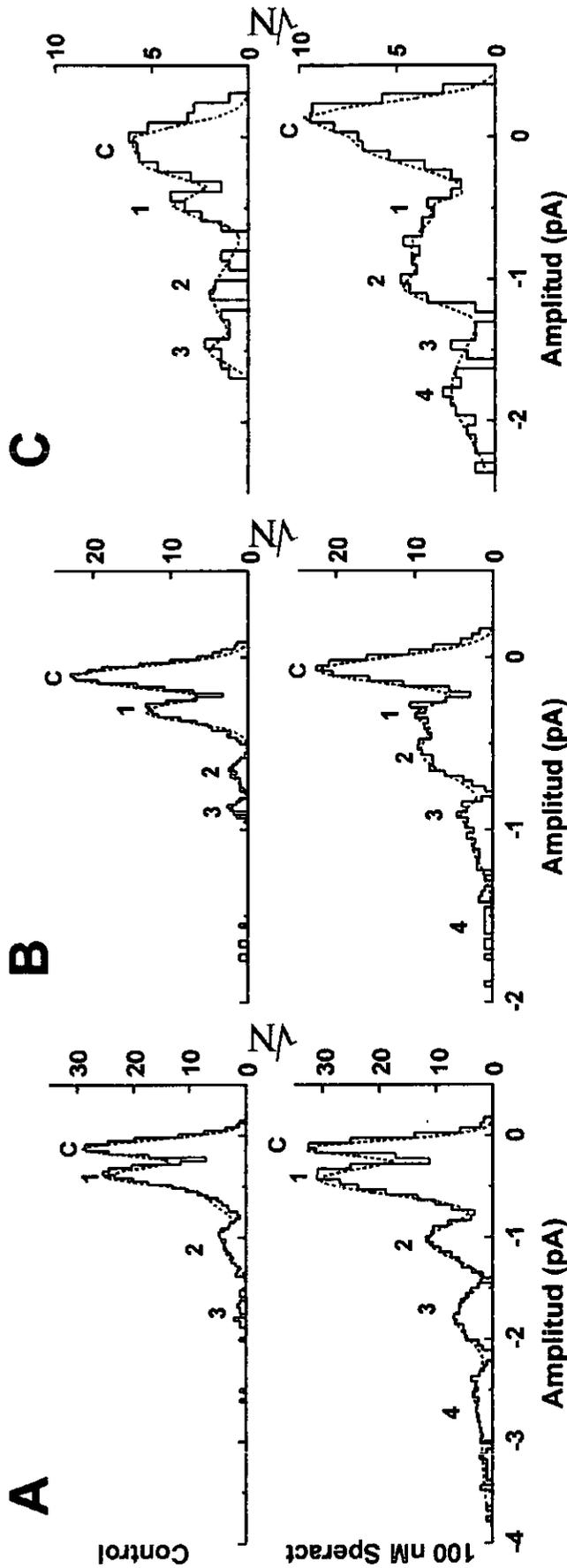
Para tratar de definir que canales iónicos son activados por el Speract, se realizó un análisis de la amplitud de la corriente. En la Figura 6 se muestra los histogramas de distribución de la amplitud de la corriente obtenidos del análisis de 3 experimentos en los cuales se registró el efecto del Speract sobre las diferentes conductancias presentes en los parches.



**Figura 5. El Speract activa diferentes canales iónicos en espermatozoides hinchados del erizo de mar.**

**A.** Registro de la corriente iónica en un parche en célula unida antes y después de la aplicación de 100 nM de Speract. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. El Em durante el registro fue de -50 mV. Los saltos discretos hacia abajo denotan aperturas de canales (O) desde el estado cerrado (C).

**B.** Probabilidad de apertura ( $P_o$ ) en presencia ó en ausencia de 100 nM de Speract. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de 6 experimentos diferentes.



**FIGURA 6. El Speract activa diferentes niveles de conductancia en espermatozoides hinchados de erizo de mar.**  
 A-C. Histogramas de distribución de la amplitud de la corriente de tres experimentos distintos obtenidos en condiciones Control (histograma superior de cada panel) y en presencia de 100 nM de Speract (histograma inferior de cada panel) a un  $E_m = -110$  mV. Cada histograma fue obtenido a partir de la lista de eventos para cada condición donde  $\sqrt{n}$  es el logaritmo del número de eventos. La línea punteada es el mejor ajuste de los datos experimentales a la suma de  $n$  distribuciones normales. La solución de registro utilizada en la pipeta contenía: 30 mM KCl, 50 mM Sacarosa, 0.1 mM EDTA, 10 mM HEPES pH 7 y la solución del baño utilizada fue AMA1:10. En cada histograma, la C indica el pico correspondiente al estado cerrado y los números indican los picos correspondientes a los diferentes niveles de amplitud.

Estos registros se realizaron a un  $E_m = -110$  mV y utilizando una solución de registro en la pipeta que contenía 30 mM KCl. Se puede observar que la adición de Speract (100 nM) incrementa la  $P_o$  promedio de los diferentes canales presentes en los registros; específicamente se incrementa la  $P_o$  de las conductancias que se observan en los registros Control y se activan conductancias adicionales a éstas. En dichos experimentos se pueden destacar algunas de las conductancias más representativas y su respuesta al Speract tal y como se describe a continuación: la  $P_o$  de la conductancia de  $\sim 8$  pS se incrementa entre 3 a 7 veces, mientras que la  $P_o$  de la conductancia de  $\sim 10$  pS aumenta entre 2 y 6 veces, mientras que la  $P_o$  de la conductancia de  $\sim 15$  pS se incrementa entre 5 y 30 veces.

Resultados cualitativamente similares se obtuvieron experimentos adicionales donde se modificó la composición de la solución de registro de la pipeta y el  $E_m$  al cual se realizó el registro. En estas condiciones, cuando la solución en el interior de la pipeta contenía 49 mM de NaCl y 10 mM de KCl, se observó que el Speract incrementaba la  $P_o$  promedio de los canales, sin embargo a diferencia de los experimentos que se muestran en la Figura 6, las conductancias registradas en estas condiciones son de mayor magnitud (en el rango de 30 a 60 pS).

Los valores de conductancia obtenidos en este análisis presentan cierta variabilidad, ya que la activación simultánea de varios canales iónicos en estos registros no permite determinar con exactitud los diferentes niveles de corriente. Lo anterior se debe a que se observan múltiples transiciones de manera desordenada entre los niveles de corriente. Aún así esta información se muestra para hacer notar que el Speract incrementa drásticamente la actividad de diferentes canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar.

En la Tabla I se resumen los valores de conductancia de los canales iónicos presentes tanto

en los registros control (antes de la perfusión con el Speract), como en presencia de 100 nM de Speract. Los valores de conductancia y de  $E_r$  fueron calculados a partir de las curvas I-V obtenidas en condiciones control.

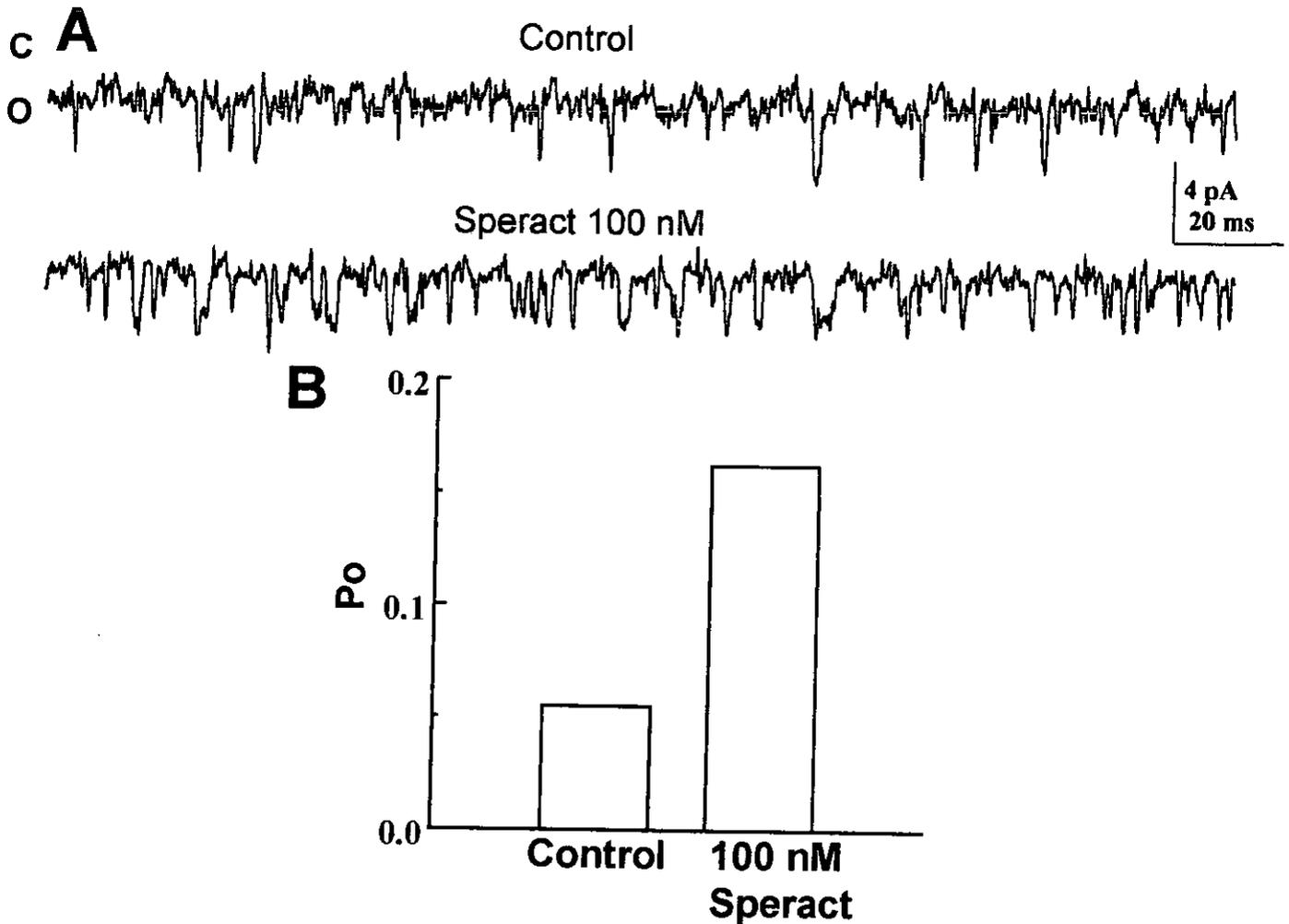
**Tabla I.** Conductancias unitarias presentes en los experimentos de *patch-clamp* en los que se observó la activación por Speract en espermatozoides hinchados de erizo de mar.

| Conductancia Unitaria (pS) | $E_r$ ( $E_{K^+}$ ) (mV) | Selectividad | Solución Pipeta* | n |
|----------------------------|--------------------------|--------------|------------------|---|
| 8                          | -48.5 (-45.3)            | Catiónico    | 2                | 3 |
| 10                         | -72 (-73)                | Catiónico    | 1                | 3 |
| 14                         | -45 (-45.3)              | Catiónico    | 2                | 3 |
| 17                         | -45.5 (-45.3)            | Catiónico    | 2                | 1 |
| 27                         | -47.2 (-45.3)            | Catiónico    | 2                | 1 |
| 29                         | -46.4 (-45.3)            | Catiónico    | 2                | 1 |
| 33                         | -54.5 (-73)              | Catiónico    | 1                | 1 |
| 43                         | -68 (-73)                | Catiónico    | 1                | 2 |
| 47                         | -40.5(-45.3)             | Catiónico    | 2                | 1 |
| 53                         | -52.8 (-73)              | Catiónico    | 1                | 1 |

\* La composición de la solución de la pipeta varió en cada experimento de acuerdo al siguiente código numérico: 1) 49 mM NaCl, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2.5 NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES pH 7. 2) 30mM KCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM Sacarosa, 10 mM HEPES pH 7. En todos los experimentos se utilizó AMA1:10 como solución en el baño. **n** = número de experimentos en los que se encuentra la conductancia.

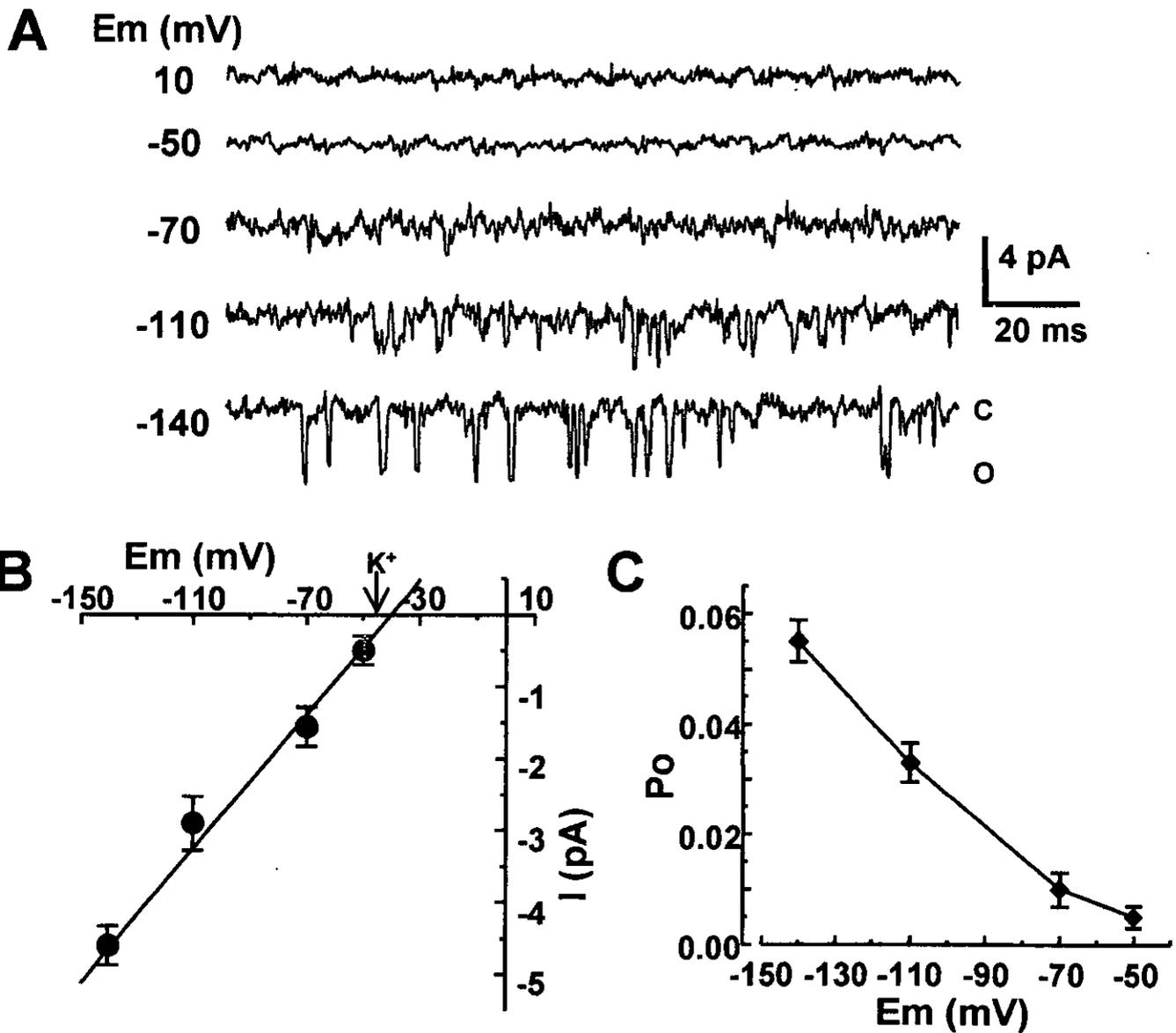
Adicionalmente quisiera resaltar un experimento en específico en donde se logró registrar la activación de un solo canal iónico por el Speract en un espermatozoide hinchado de *S. purpuratus* (Figura 7). El Speract produce un aumento de cerca de 3 veces en la probabilidad de apertura ( $P_o$ ) del canal (Figura 7). Este canal presenta una baja  $P_o$  y una pobre dependencia al voltaje (Figura 8). Asimismo, la  $P_o$  del canal aumenta a pulsos hiperpolarizantes. En nuestras condiciones de registro el canal resultó ser selectivo a cationes, tener una

conductancia unitaria ( $\gamma$ ) de 47 pS y un potencial de inversión ( $E_{rev}$ ), medido a partir de la curva corriente-voltaje (I-V) de -40.5 mV (Figura 8B). Este potencial se encuentra cercano al potencial de equilibrio del  $K^+$  ( $E_K = -45.3$  mV).



**Figura 7. El Speract activa un canal catiónico del espermatozoide de erizo de mar.**

**A.** Trazos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario en un parche en célula unida, antes (Control) y después de la adición de 100 nM de Speract. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). **B.** Probabilidad de apertura del canal ( $P_o$ ) en presencia o ausencia de 100 nM Speract para el experimento que se muestra en A.



**Figura 8. Canal catiónico de 47 pS registrado en espermatozoides hinchados del erizo de mar.**

**A.** Trazos de la actividad de canales unitarios en el estado estacionario en un parche en célula unida del canal de 47 pS. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). **B.** Curva I-V del canal, el valor promedio de corriente a cada potencial, se obtuvo del ajuste de los histogramas de amplitud de la corriente a una distribución normal. La flecha indica el  $E_{K^+}$ . **C.**  $P_o$  en función del potencial de membrana, el porcentaje de tiempo abierto se calculó de la lista de eventos a cada voltaje aplicado. En B y C, cada punto representa el promedio  $\pm$  ES obtenido de 3 parches.

Cabe señalar aquí, que este canal de 47 pS así como los y los canales mencionados en la Tabla I son distintos al único canal iónico activado por el Speract reportado con anterioridad, el cual corresponde a un canal selectivo a  $K^+$  de 5 pS (Babcock *et al*, 1992).

El Speract no es capaz de pasar a través de la membrana plasmática. Considerando que nuestros experimentos se realizaron en la configuración de célula unida, la activación de canales iónicos inducida por este decapeptido debe estar mediada por segundos mensajeros. Esto concuerda con el modelo de la activación del espermatozoide por el Speract. Así, al unirse el Speract a su receptor en la membrana plasmática se activa la guanilato ciclasa, produciéndose GMPc, lo cual inicia una cascada de señalización intracelular que resulta en la activación de diferentes canales iónicos (Darszon *et al*, 1999).

Durante la respuesta al Speract, el incremento en la concentración de nucleótidos cíclicos en el citoplasma es esencial para la activación de canales iónicos (Labarca *et al*, 1996, Darszon *et al*, 1999, Galindo *et al*, 2000). Se sabe que el Speract activa canales de  $K^+$  al estimular transitoriamente a la guanilato ciclasa (Lee y Garbers 1986, Cook y Babcock, 1993b) y se cree que esta activación se debe a la acción directa del GMPc sobre canales selectivos para  $K^+$  (Galindo *et al*, 2000). Adicionalmente, dentro de la cascada de eventos inducida por el Speract, se activa la adenilato ciclasa, incrementando la [AMPc]<sub>i</sub> (Cook y Babcock, 1993a), lo que probablemente activaría canales iónicos directamente (Labarca *et al*, 1994; Gauss *et al*, 1998; Cook y Babcock, 1993a).

Hasta el momento no se habían registrado directamente en el espermatozoide canales iónicos que se activasen directamente por GMPc o AMPc. Durante la realización de este trabajo nos enfocamos a la búsqueda y caracterización de los canales iónicos del espermatozoide que se pudieran activar y/o modular por GMPc y AMPc. Algunos de estos

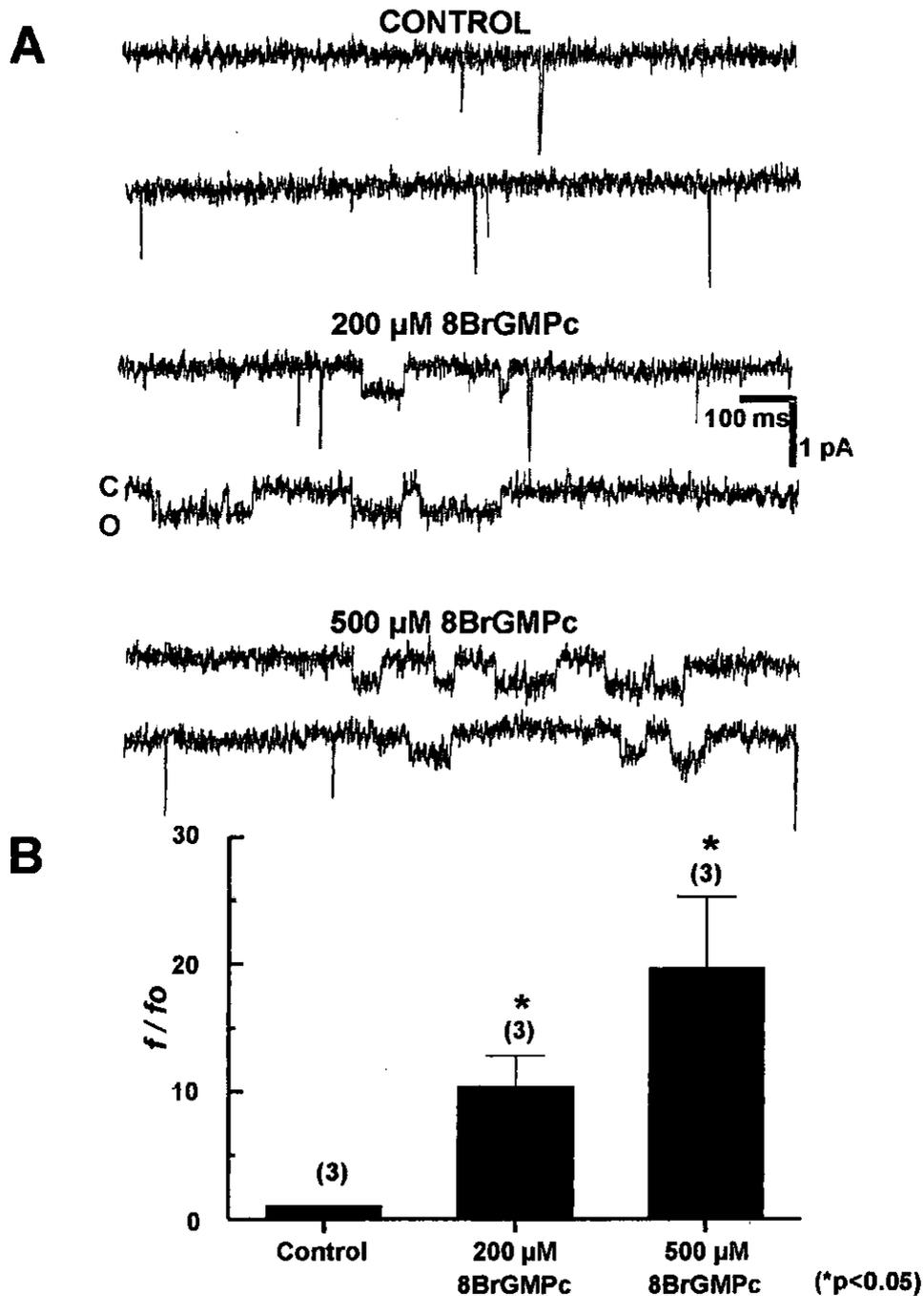
canales podrían ser responsables de los cambios en el Em que se observan en la respuesta fisiológica al Speract.

### C. Activación de un canal de K<sup>+</sup> por GMPc.

Estudios previos han demostrado que el Speract induce una hiperpolarización transitoria dependiente de K<sup>+</sup> en el espermatozoide (Garbers, 1989) y en membranas plasmáticas de flagelos de espermatozoides de *S. purpuratus* (Lee, 1988, Galindo *et al*, 2000). Este péptido incrementa la [GMPc]<sub>i</sub> y activa canales de K<sup>+</sup>, hiperpolarizando a espermatozoide hinchados de erizo de mar (Babcock *et al*, 1992, Cook y Babcock, 1993b). Se ha propuesto que la activación de estos canales se debe a la activación directa por la unión del GMPc al canal (Galindo *et al*, 2000), pero hasta el momento no se ha corroborado esta propuesta con datos experimentales.

En experimentos de *patch-clamp* en espermatozoides de erizo de mar de la especie *S. purpuratus*, tanto en la configuración de célula unida, utilizando el análogo del GMPc permeable a la membrana plasmática, el 8-bromo-GMPc (8BrGMPc), como en la configuración de parche escindido, utilizando GMPc directamente, se logró caracterizar un canal de K<sup>+</sup> que es modulado directamente por el nucleótido cíclico.

La aplicación de 200 μM de 8BrGMPc en nuestros experimentos, activa un canal de K<sup>+</sup> de 15 pS. El 8BrGMPc a esta concentración aumenta la P<sub>o</sub> 10.6 ± 3.1 veces, mientras que la aplicación de 500 μM la incrementa 19.5 ± 5.8 veces (n=3) (Figura 9). Como se observa en la figura 9A, este nucleótido no afectó la actividad de otros canales presentes en los mismos parches.



**Figura 9. Modulación por 8BrGMPc del canal de 15 pS de espermatozoides hinchados del erizo de mar.**

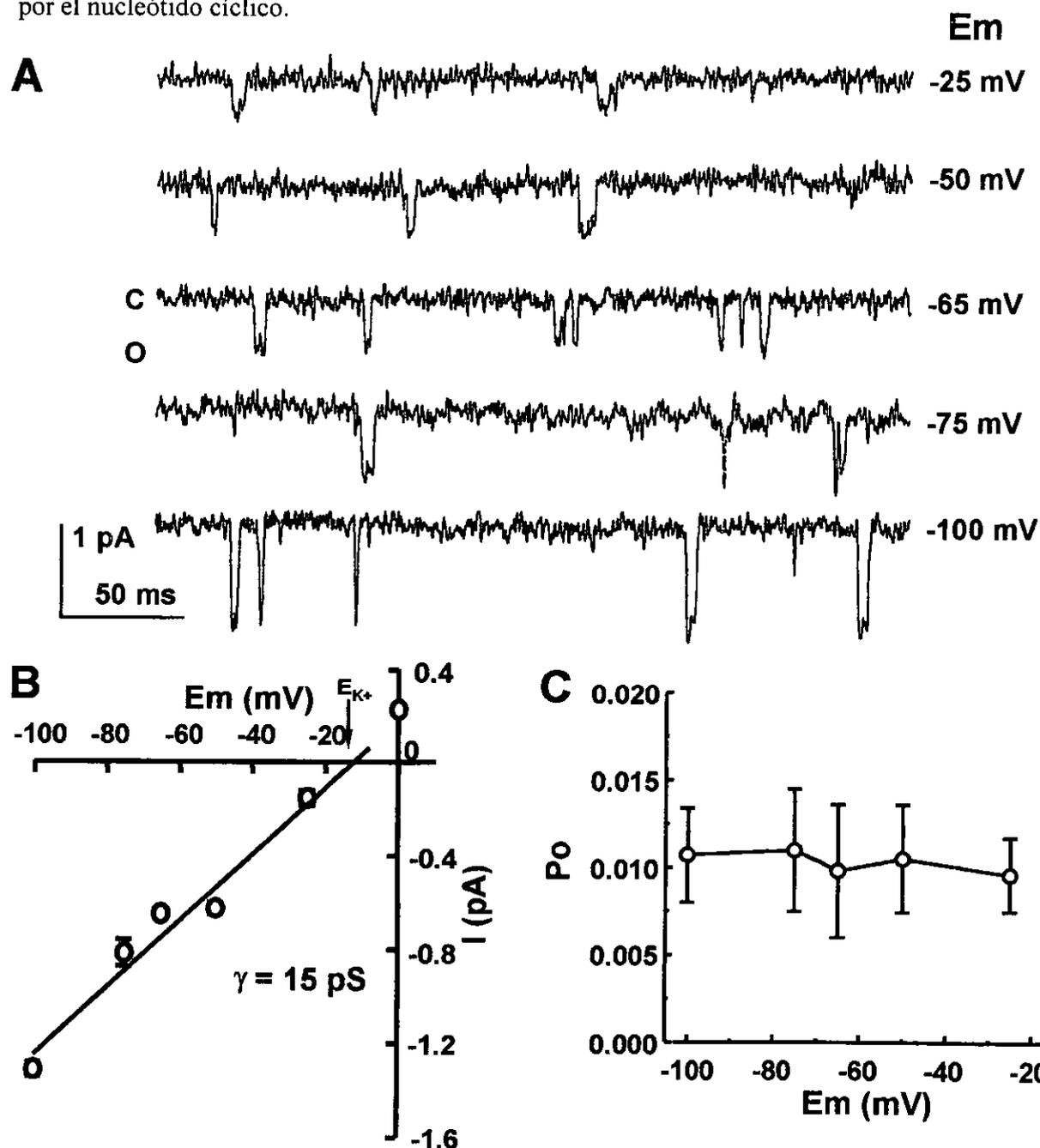
A. Trazos representativos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario en un parche en célula unida en condiciones Control y en presencia de 200 ó 500  $\mu$ M de 8BrGMPc. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). B. Curva dosis respuesta de la actividad del canal en función de la concentración de 8BrGMPc. Cada barra representan la relación  $f / f_0$ , donde  $f$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto a una [8BrGMPc] y  $f_0$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto en ausencia de 8BrGMPc. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES obtenido de 3 experimentos.

En nuestras condiciones de registro el canal presenta una conductancia unitaria ( $\gamma$ ) de  $15 \pm 0.47$  pS ( $n=3$ ). En cuanto a su selectividad, el canal muestra un  $E_r = -14.5$  mV, calculado a partir de la curva I-V, el cual es muy cercano al  $E_K$  ( $-14.9$  mV). Con estos resultados se calcula una  $P_K/P_{Na} \sim 30$ . En ausencia de GMPC la probabilidad de apertura del canal es muy baja ( $P_o \sim 1\%$ ,  $E_{pipeta} = 0$  mV) y no se observa que sea voltaje dependiente (Figura 10).

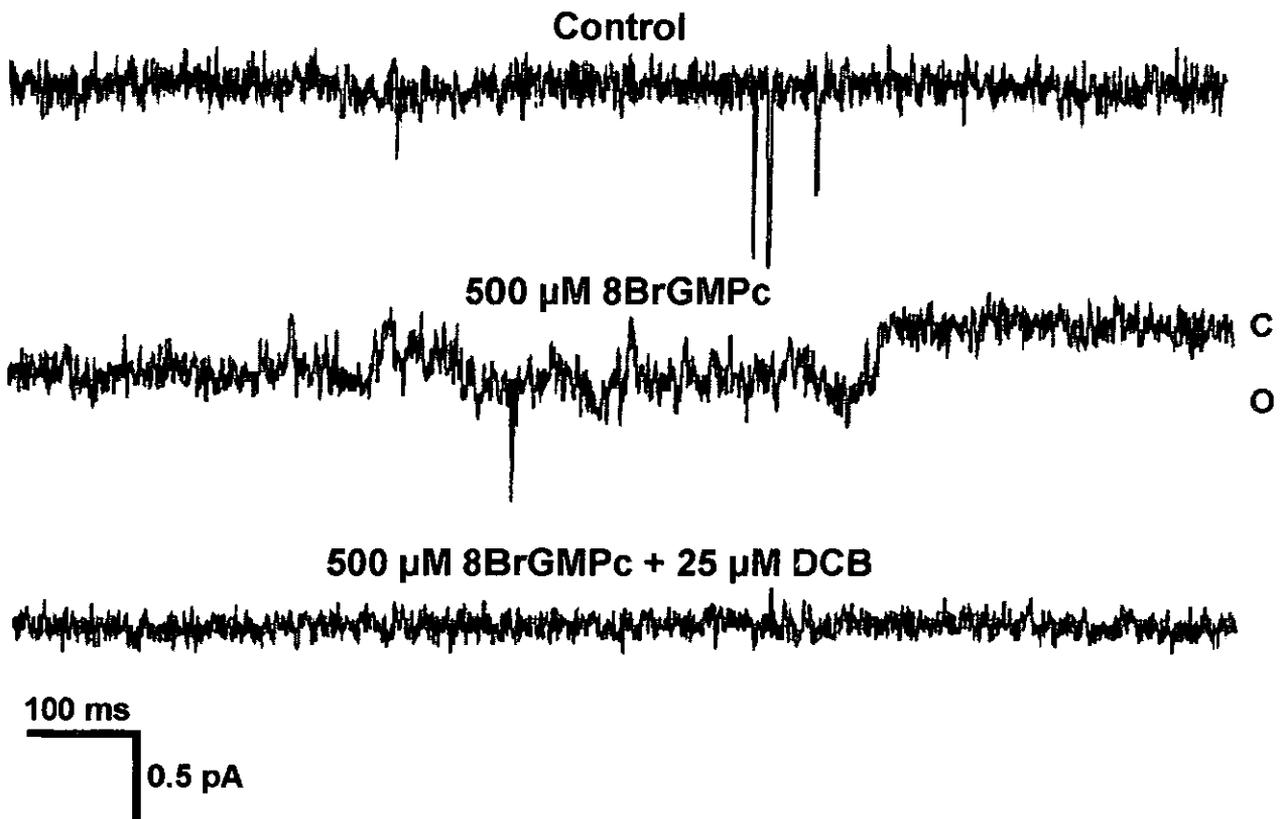
Este canal podría ser similar al canal altamente selectivo a  $K^+$  presente en los fotorreceptores ciliares de *P. irradians* (Gómez y Nasi, 1995). Dicho canal se activa directamente por GMPC e hiperpolariza al fotorreceptor en respuesta a la estimulación por luz (Gómez y Nasi, 1995). Es posible que algo similar suceda en el flagelo del espermatozoide de erizo de mar.

La utilización de fármacos que modulan la actividad de los canales iónicos ha sido de gran ayuda para establecer y distinguir, de acuerdo a su especificidad, a las distintas familias de canales iónicos. Sin embargo, en el caso de la familia de canales iónicos activados por nucleótidos cíclicos (canales CNG), todavía no se conoce ningún bloqueador que sea lo altamente específico. No obstante, el 3',4' Diclorobenzamil (DCB) se ha utilizado como bloqueador de los canales CNG en los fotorreceptores de mamífero (Nicol *et al*, 1987) y de los canales de  $K^+$  modulados por GMPC (Gómez y Nasi, 1997). Interesantemente, este compuesto ha mostrado inhibir la respuesta del Speract y la hiperpolarización inducida por el 8BrGMPC en vesículas de flagelos de espermatozoide de erizo de mar (Galindo *et al*, 2000). En nuestros experimentos, a una concentración de  $25 \mu\text{M}$  el DCB bloqueó completamente al canal de  $15$  pS activado por  $500 \mu\text{M}$  8BrGMPC (Figura 11). Este resultado apoya la propuesta de que este canal de  $K^+$  podría ser similar a los de la familia de canales CNG y ser activado directamente

por el nucleótido cíclico.



**Figura 10. Canal de 15 pS selectivo a  $K^+$  de espermatozoides hinchados del erizo de mar.**  
**A.** Trazos representativos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario a diferentes potenciales de membrana, en un parche en célula unida. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). **B.** Curva I-V para el canal registrado en A, el valor promedio de corriente a cada potencial se obtuvo del ajuste de los histogramas de amplitud de la corriente a una distribución normal. La flecha indica el potencial de equilibrio para  $K^+$ . **C.**  $P_o$  en función del potencial de membrana, el porcentaje de tiempo abierto se calculó de la lista de eventos a cada voltaje aplicado. Cada punto en B y C representa el promedio  $\pm$  ES obtenido de 3 experimentos.



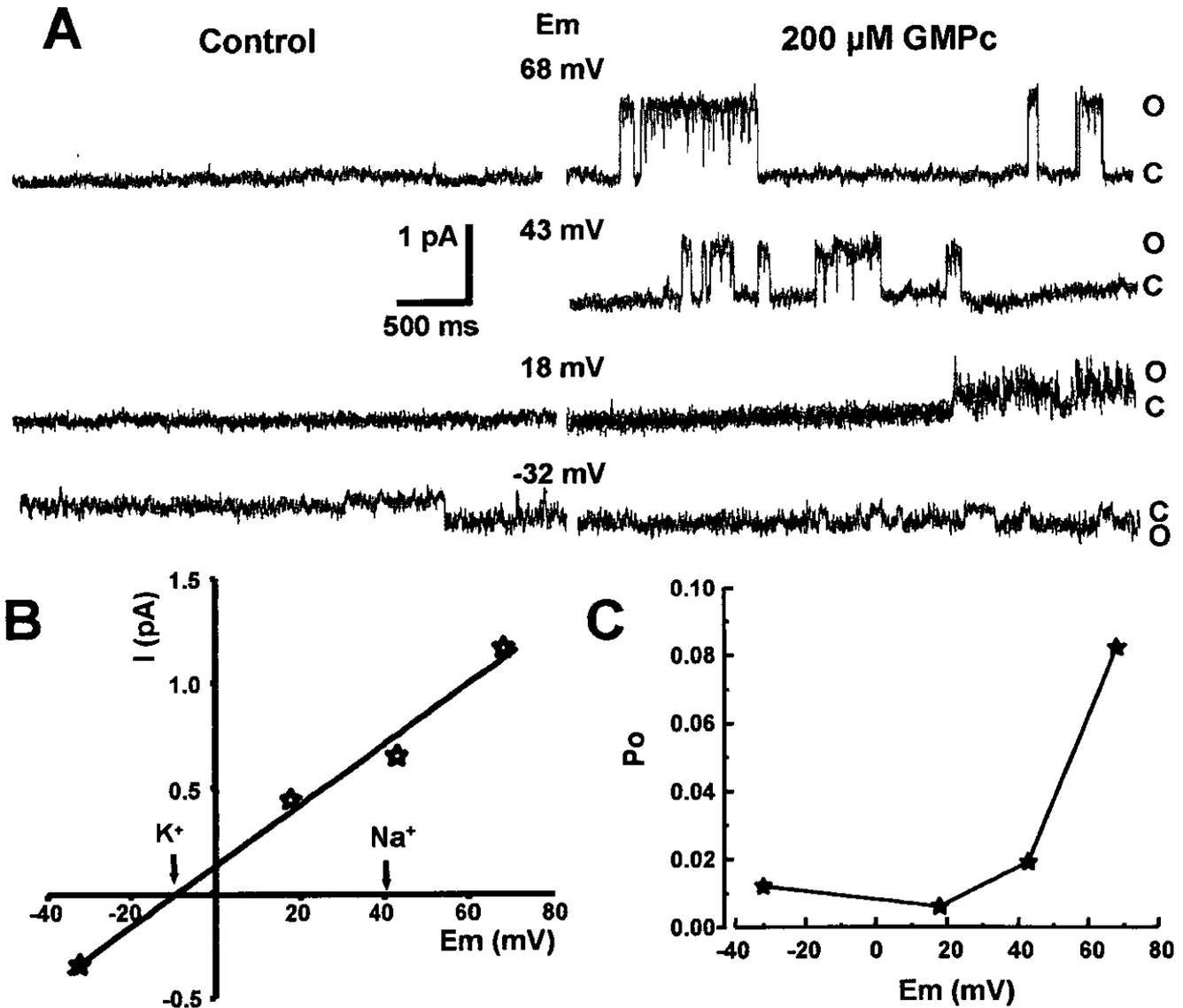
**Figura 11. El DCB bloquea el canal activado de 15 pS activado por 8BrGMPc.**  
 Trazos representativos de dos experimentos donde se muestra la actividad de canales unitarios en estado estacionario en un parche en célula unida en condiciones Control, en presencia de 500  $\mu\text{M}$  8BrGMPc o de 500  $\mu\text{M}$  8BrGMPc + 25  $\mu\text{M}$  de DCB. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. El potencial aplicado en la pipeta durante el registro fue de 0mV. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C).

La manera más confiable para demostrar que el GMPc activa directamente este canal de  $K^+$ , es realizar experimentos de *patch-clamp* en la configuración de parche escindido en la modalidad “*inside-out*”. En esta configuración la superficie interior de la membrana plasmática queda expuesta a la solución del baño y en ausencia de cualquier componente soluble citoplasmático. Si el canal fuera sensible al efecto directo del GMPc, al perfundir el nucleótido cíclico directamente sobre la cara citoplásmica del canal éste debería activarse.

Pese a que en general se tuvo poco éxito en la realización de experimentos con parches escindidos ( $n=17$ ), debido a las dificultades técnicas inherentes, en dos ocasiones distintas se logro registrar en parches independientes la activación de un canal de  $K^+$  de 15 pS en respuesta a la aplicación de 200  $\mu$ M GMPc (Figura 12A). En estas condiciones el  $E_{rev}$  calculado de la curva I-V es muy cercano al  $E_K$  (Figura 12B) y de él se estimó una razón de permeabilidad  $P_K/P_{Na} \sim 68$ , lo que muestra una alta selectividad a  $K^+$ . En estas condiciones, el canal de 15 pS mostró una débil dependencia al voltaje (Figura 12C), ya que la  $P_o$  del canal aumentó ligeramente a  $E_m$  positivos. Este comportamiento del canal difiere de lo observado en los registros en la configuración de célula unida donde este canal no mostró dependencia al voltaje.

Una característica de los canales CNG es que conducen  $Ca^{2+}$  adicionalmente al  $K^+$  y  $Na^+$ . De cualquier manera esta permeabilidad a cationes divalentes es muy reducida en comparación a la de cationes monovalentes. Por lo tanto, al permear el  $Ca^{2+}$  a través del poro del canal se observa una disminución en la corriente neta, en presencia de monovalentes (Gómez y Nasi, 1996, Nasi y Gómez, 1999, Hackos y Korenbrot, 1999, Dzeja *et al*, 1999, Frings, 1999). Esto se ha observado en los fotorreceptores, donde el  $Ca^{2+}$  y el  $Mg^{2+}$

extracelular disminuyen la conductancia activada por GMPc (Yau y Baylor, 1989, Nakatani y Yau, 1988).



**Figura 12. El canal de 15 pS se activa directamente por GMPc.**

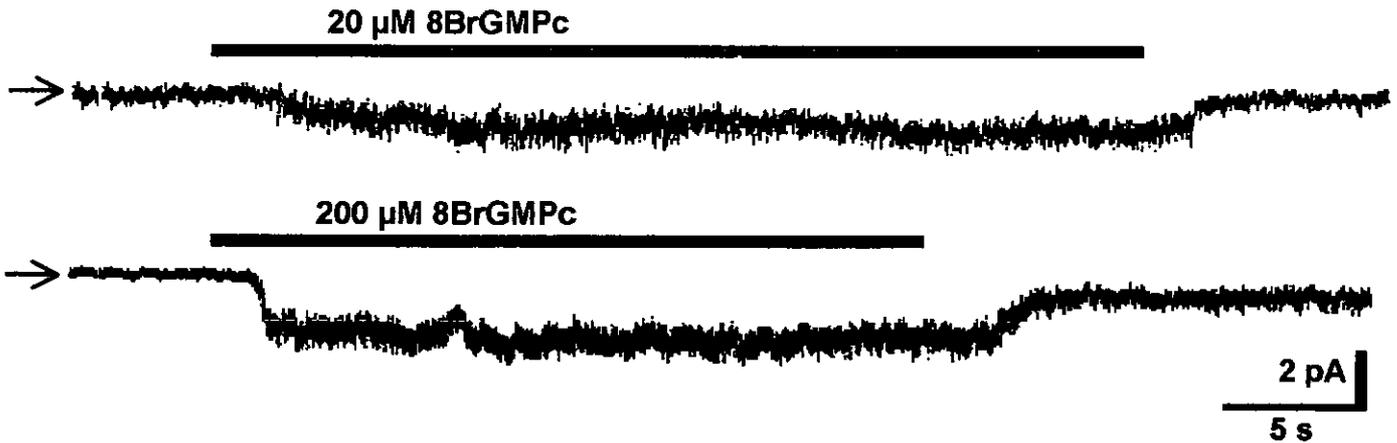
**A.** Trazos representativos de dos experimentos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario en un parche escindido en la configuración “inside-out” en condiciones Control o en presencia de 200  $\mu$ M GMPc. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia arriba o hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). **B.** Curva I-V para el canal activado por GMPc, el valor promedio de corriente a cada potencial se obtuvo del ajuste de los histogramas de amplitud de la corriente a una distribución normal. Las flechas indican el potencial de equilibrio para K<sup>+</sup> y para Na<sup>+</sup> respectivamente. **C.** Po en función del potencial de membrana, el porcentaje de tiempo abierto se calculó de la lista de eventos a cada voltaje aplicado. Cada punto en B y C representa el promedio obtenido de 2 experimentos.

Aun más, se observó que este bloqueo de los canales CNG por cationes divalentes es el responsable del ruido eléctrico sensible a la luz, registrado en los conos y bastones de la retina (Haynes *et al.*, 1986).

En los experimentos en la configuración de célula unida se puede observar que al tener 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  en la pipeta de registro, en presencia de 20  $\mu\text{M}$  o 200  $\mu\text{M}$  8BrGMPc, se activaba una corriente mientras duraba la perfusión del nucleótido cíclico, de la cual no se podían distinguir transiciones de canal unitario (Figura 13). Por tal motivo se decidió realizar un análisis del ruido eléctrico de la corriente activada por el GMPc, para determinar los parámetros cinéticos y de amplitud de los canales iónicos que daban lugar a esta corriente. Los valores calculados para la amplitud, duración promedio de las transiciones y conductancia unitaria de los canales activados por el GMPc se muestran en la Tabla II. En ella también se muestran los valores reportados para la corriente activada por GMPc en parches escindidos del segmento externo del fotorreceptor (Yau y Baylor, 1989). En ambos sistemas los valores obtenidos son similares, lo que nos permite pensar que los canales activados por 8BrGMPc en el espermatozoide hinchado, también son susceptibles de ser bloqueados por cationes divalentes, como sucede en los canales CNG de los fotorreceptores (Yau y Baylor, 1989).

#### **D. Activación de canales catiónicos por el AMPc.**

Además del aumento en la concentración de GMPc, se sabe que la concentración intracelular de AMPc se incrementa durante la respuesta al Speract. La adenilato ciclasa del espermatozoide del erizo de mar se activa por los cambios en el Em, pHi y  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  que se inducen por el Speract (Beltrán *et al.* 1996, Cook y Babcock 1993a, Garbers 1989).



**Figura 13. El 8BrGMPc activa una corriente iónica en presencia de cationes divalentes.** Registro de la corriente iónica en un parche en célula unida antes y después de la aplicación de 20 ó 200  $\mu\text{M}$  de 8BrGMPc. La solución de registro en la pipeta fue AMA1:10. El registro de las corrientes iónicas se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. El Em durante el registro fue de  $-50\text{ mV}$ . La flecha a la izquierda de cada registro indica el nivel basal de la corriente antes de la adición del nucleótido.

**Tabla II.** Parametros biofísicos calculados para la corriente iónica activada por 8BrGMPc en espermatozoides hinchados de erizo de mar.

|  | duración promedio    | amplitud             | conductancia             | cationes divalentes              |
|--|----------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Corriente de ruido activada por 8BrGMPc en espermatozoides hinchados (cell attach, $n=4$ ).          | $16 \pm 3\text{ ms}$ | $18 \pm 4\text{ fA}$ | $0.9 \pm 0.15\text{ pS}$ | $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ |
| (*)Corriente de ruido activada por GMPc en parches escindidos del segmento externo del fotoreceptor. | $1\text{ ms}$        | $2-4\text{ fA}$      | $0.1\text{ pS}$          | $\text{Ca}^{2+}$                 |

(\*) Yau y Baylor, 1989

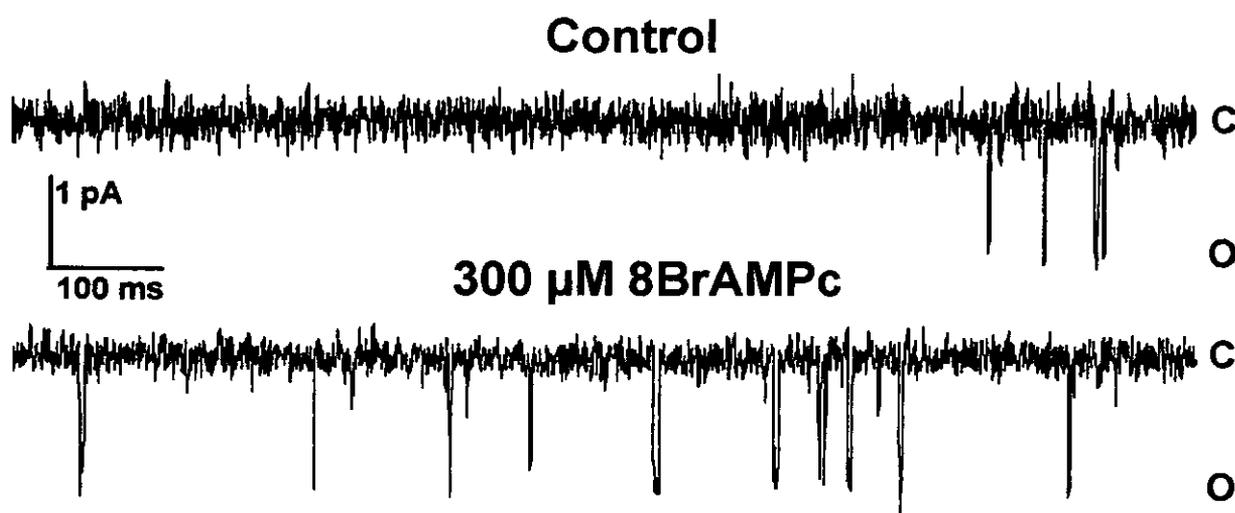
Con estos antecedentes decidimos explorar la posibilidad de que el AMPc pudiera afectar la actividad funcional de los canales iónicos en el espermatozoide. Para determinar el efecto del AMPc sobre los canales iónicos registrados en nuestros experimentos, se utilizaron los análogos permeables del AMPc, dibutilil-AMPc (dbAMPc) y 8-bromo AMPc (8BrAMPc). Como se puede apreciar en la Figura 14, el dbAMPc induce la activación de un canal iónico en el espermatozoide del erizo de mar. La  $P_o$  de dicho canal aumenta significativamente después de la perfusión de la célula con 300  $\mu$ M de dbAMPc.

Cuantitativamente, la adición de 300  $\mu$ M de dbAMPc incrementa la  $P_o$  del canal, estimada a un potencial aplicado de 0 mV, en 5.1 veces en promedio, de  $0.3 \pm 0.08$  % a  $1.53 \pm 0.47$  % (n=6). A 1 mM de dbAMPc, la  $P_o$  se incrementa en 11.6 veces, a  $3.5 \pm 0.9$  % (n=2). En la Figura 14B se resume la dosis dependencia a la concentración de la activación del canal por el dbAMPc, la línea punteada es el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación:

$$f/f_o = 1 + (f_{max}([db-cAMP]/([db-cAMP] + K_d))),$$

donde,  $f$  es la fracción de tiempo en la que el canal permanece en el estado abierto a cierta concentración de dbAMPc,  $f_o$  es la fracción de tiempo en la que el canal se encuentra en el estado abierto en ausencia del nucleótido,  $f_{max}$  es el valor de  $f/f_o$  a concentraciones altas de dbAMPc y  $K_d$  es la constante aparente de disociación. En estas condiciones, el valor de  $K_d$  estimado fue de 876  $\mu$ M. Este valor de  $K_d$  probablemente se encuentre sobrestimado ya que la concentración intracelular de dbAMPc debe ser mucho menor que la añadida en el exterior de la célula. La adición de 300  $\mu$ M de otro análogo permeable del AMPc, el 8BrAMPc, también incrementa la actividad de este canal (Figura 15), de la misma forma que lo hace el dbAMPc aumentando la  $P_o$  del canal, estimada a un potencial aplicado de 0 mV, en 4.7 veces en promedio, de  $0.23 \pm 0.09$  % a  $1.1 \pm 0.34$  % (n=3).





**Figura 15. El 8BrAMPc también activa al canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar.** Trazos representativos de tres experimentos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario en un parche en célula unida, en condiciones Control o en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de 8BrAMPc. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C).

Por el contrario, el 8BrGMPC, análogo permeable del GMPC, a concentraciones  $>200 \mu\text{M}$ , no afectó la actividad de este tipo de canales.

En los experimentos se observó que el dbAMPC activaba esencialmente dos conductancias. En la Figura 16 se muestra los registros a diferentes potenciales de los canales unitarios en estado estacionario, de las dos conductancias moduladas por el dbAMPC, en ausencia del nucleótido. Las transiciones entre el estado cerrado y el abierto en ambas conductancias muestran una cinética rápida, observándose frecuentemente transiciones en forma de espiga.

En nuestras condiciones de registro, una de las conductancias (Figura 16A panel derecho) tuvo un valor de  $\gamma = 43 \pm 1.7 \text{ pS}$ , calculado de la regresión lineal de la curva I-V promedio de 5 experimentos diferentes (Figura 16B). El potencial de inversión de la corriente fue  $-11.7 \pm 1.7 \text{ mV}$ , este potencial de inversión se encuentra entre el  $E_{\text{Na}}$  ( $23.2 \text{ mV}$ ) y el  $E_{\text{K}}$  ( $-14.9 \text{ mV}$ ), indicando su selectividad a cationes. El canal responsable de estas transiciones muestra una baja probabilidad de apertura a los potenciales aplicados ( $P_o < 1 \%$ ) y es pobremente dependiente del voltaje (Figura 16C). La fracción de tiempo que pasa el canal en el estado abierto depende ligeramente del potencial de membrana. Por otra parte, la constante de tiempo del estado abierto ( $\tau_o$ ), estimada a partir de la distribución de los tiempos que el canal se encuentra en el estado abierto, fue esencialmente independiente del potencial de membrana en el rango fisiológico (Figura 16D).

La otra conductancia modulada por el dbAMPC, tiene un valor de  $\gamma = 31 \pm 1.2 \text{ pS}$  (Figura 16A panel izquierdo). Del ajuste lineal de la curva I-V se calculó un potencial de inversión de  $-12.8 \pm 2.1 \text{ mV}$ , al igual que en la conductancia mencionada anteriormente este potencial de inversión se encuentra entre el  $E_{\text{Na}}$  ( $23.2 \text{ mV}$ ) y el  $E_{\text{K}}$  ( $-14.9 \text{ mV}$ ), indicando una selectividad

por cationes (Figura 16B). La probabilidad de apertura de estas transiciones también es muy baja ( $P_o < 1\%$ ) (Figura 16C) y prácticamente no es voltaje dependiente en el rango de 0 a  $-100$  mV (Figura. 16D).

La razón de permeabilidad,  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ , fue de 3.5 para la conductancia de 31 pS y 2.8 para la conductancia de 43 pS. Estos valores indican una baja selectividad entre estos dos cationes monovalentes, ya que los canales aparentemente conducen solamente 3 veces más  $K^+$  que  $Na^+$ .

Como se puede ver, las propiedades de las dos conductancias que se modulan por el dbAMPC comparten varias de sus propiedades fundamentales: ambas son selectivas a cationes con una  $P_{K^+}/P_{Na^+}$  de  $\sim 3$ , tienen baja probabilidad de apertura y son ligeramente dependientes al voltaje. A pesar de que prácticamente nunca se encontraron ambas conductancias en un mismo registro, el que presenten propiedades similares sugiere que un mismo canal con dos estados de conductancia distintos podría ser el responsable de ellas.

En 1998, Gauss et al. clonaron un canal que se activa por hiperpolarización y se modula por el AMPc a partir de espermatozoides de erizo de mar (Gauss et al, 1998). Este canal se clasificó como miembro de la familia de canales HCN y actualmente se conoce como SpHCN (Kaupp y Seifert, 2001). El canal SpHCN se clonó del testículo de erizos de mar de la especie *S. purpuratus*. Utilizando un anticuerpo contra el canal SpHCN se observó su localización principalmente en el flagelo de espermatozoides de *S. purpuratus* (Gauss et al, 1998). Utilizando este mismo anticuerpo, en experimentos de inmunocitoquímica realizados en colaboración con la Dra. Claudia Treviño (IBt-UNAM), se observó que este canal también se localiza en el flagelo de espermatozoides de *L. pictus* y que la tinción permanece aún en los espermatozoides hinchados (Figura 17).

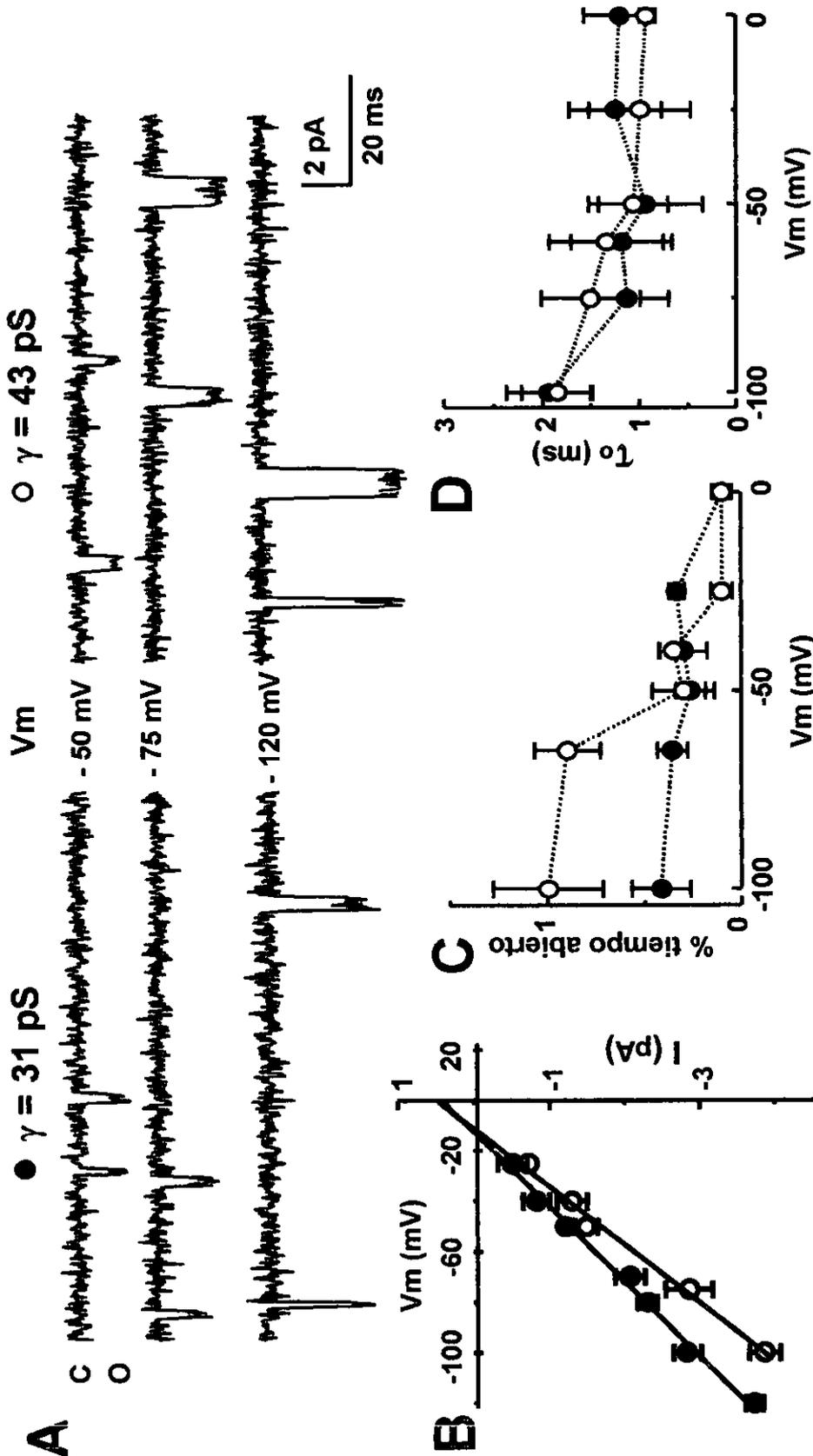
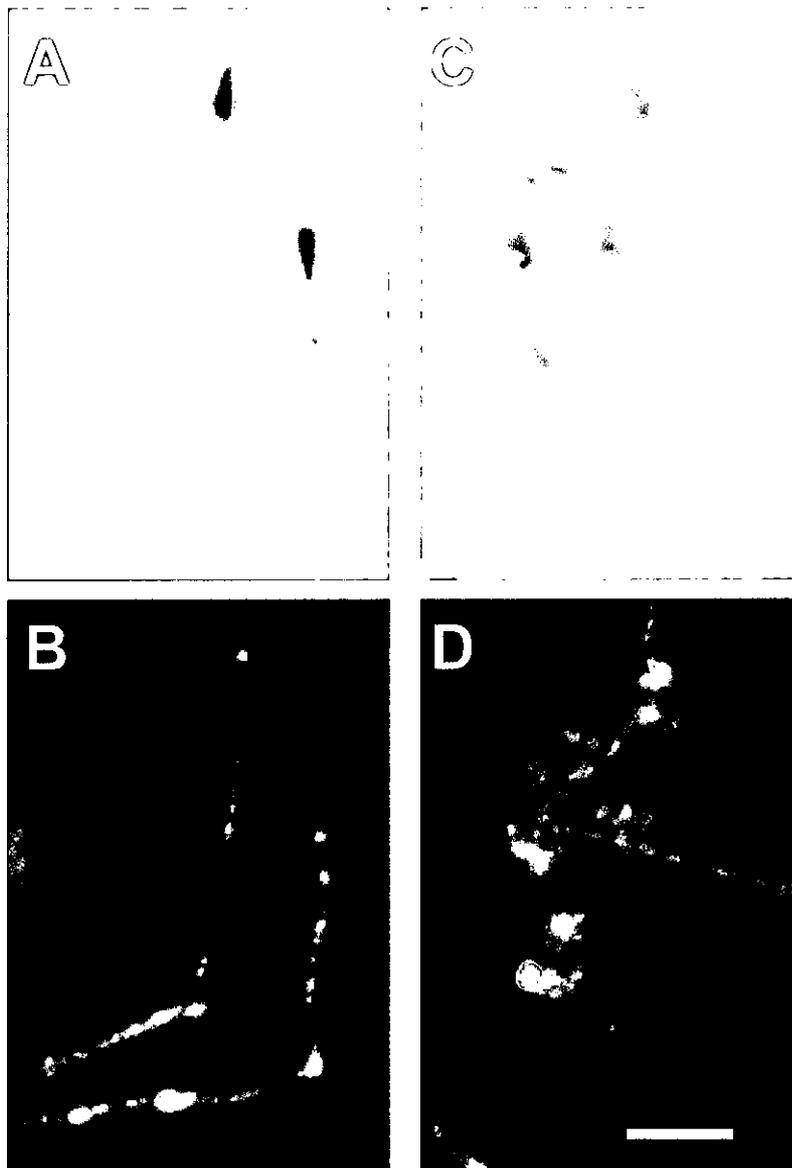


Figura 16. Conductancias de 31 y 43 pS registradas en parches de espermatozoides hinchados del erizo de mar. A. Trazos representativos de la actividad unitarios en estado estacionario en célula unida, de la conductancia de 31 pS (círculos llenos) y de la de 43 pS (círculos vacíos). El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo denotan la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). B. Curva I-V para ambas conductancias, el valor promedio de corriente a cada potencial se obtuvo del ajuste de los histogramas de amplitud de la corriente a una distribución normal. C. Po en función del potencial de membrana, el porcentaje de tiempo abierto se calculó de la lista de eventos a cada voltaje aplicado. D. Duración de los tiempos abierto ( $\tau_0$ ) en función del potencial de membrana, la constante de tiempos abiertos se calculó del ajuste de histograma de distribución del tiempo de permanencia en el estado abierto a diferentes potenciales. Cada punto representa el promedio  $\pm$  ES obtenido de 4 - 6 experimentos.



**Figura 17. Immunolocalización del canal SpHCN en espermatozoides de *L. pictus*.** Imágenes confocales de fluorescencia (B y D) y contraste de fases (A y C) de espermatozoides de *L. Pictus* marcados con el anticuerpo FPc44K como de describe en *Materiales y Métodos*. E n los paneles A y B se muestran los espermatozoides sin hinchar an AMA y en los paneles C y D se muestran los espermatozoides hinchados utilizando AMA1:10. Barra de escala 5  $\mu$ M.

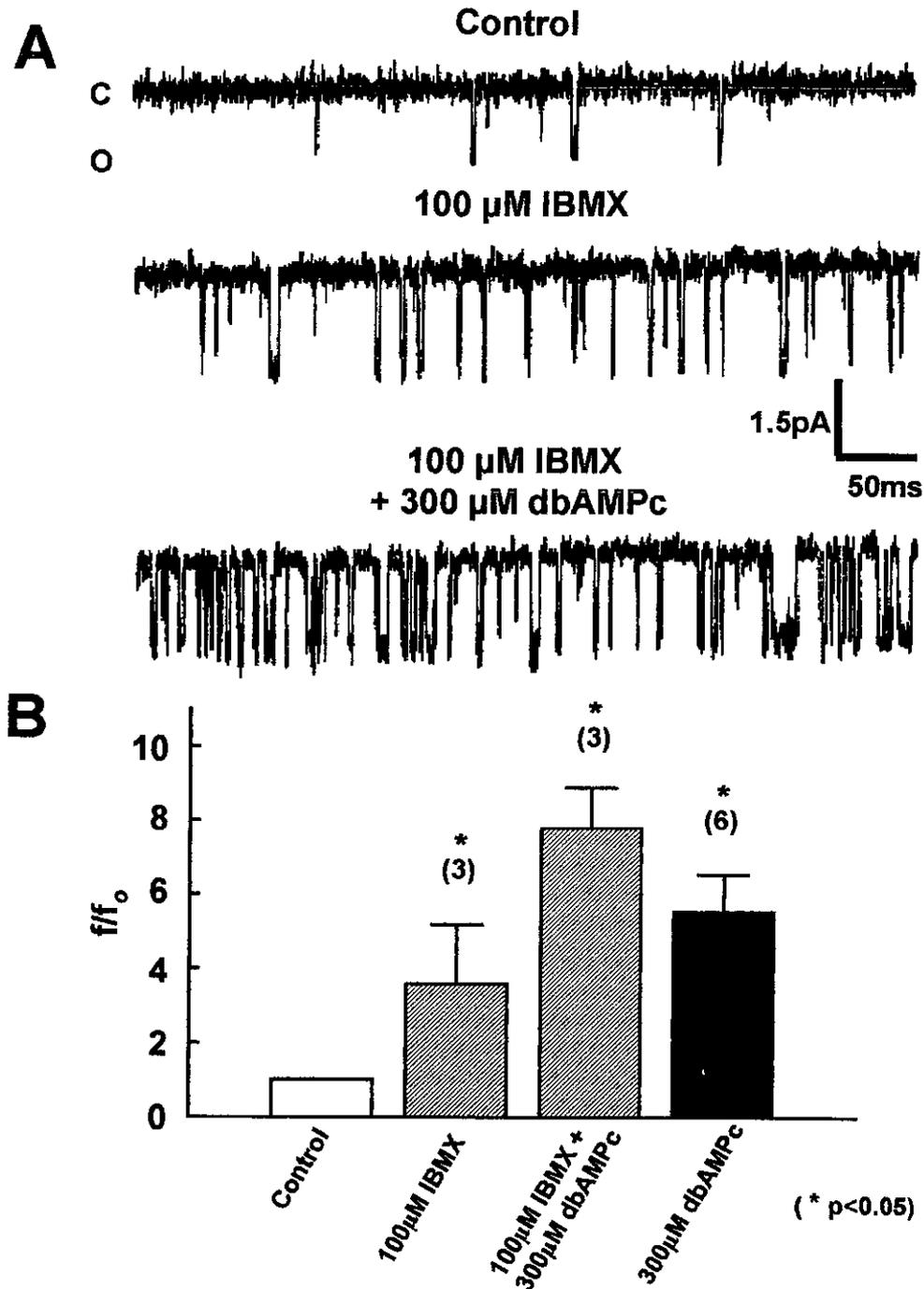
La [AMPC], en un momento dado, es el resultado del balance entre la síntesis por la adenilato ciclasa y la degradación por las fosfodiesterasas. La isobutilmetilxantina (IBMX) es un inhibidor de fosfodiesterasas que mantiene el nivel de AMPC elevado en el espermatozoide hinchado del erizo de mar (Cook y Babcock 1993a, Beltrán *et al*, 1996).

En espermatozoides hinchados sometidos a fijación de voltaje en la configuración de célula unida, la adición de 100  $\mu$ M IBMX incrementa significativamente la  $P_o$  del canal activado por AMPC, aun en ausencia del dbAMPC. El aumento en la  $P_o$  inducido por esta concentración de IBMX (de  $0.3 \pm 0.1$  % a  $1.17 \pm 0.36$  %; Figura 18A) fue equivalente al producido por la adición de 300  $\mu$ M dbAMPC por sí solo (Figura 18B). Como era de esperarse, la perfusión de 300 $\mu$ M dbAMPC en presencia del IBMX produjo un incremento aún mayor en la  $P_o$  del canal (Figura 18B).

La activación de canales iónicos por el AMPC se puede deber a la unión directa del nucleótido a un sitio específico del canal o indirectamente, a través de segundos mensajeros intracelulares, produciendo que el canal sea fosforilado por una proteína cinasa A. Por tal motivo, a continuación se intentó determinar la activación directa del canal por el AMPC en experimentos de *patch clamp* en la configuración de *inside-out*, pero a diferencia de los experimentos realizados con el GMPc, no se logró ver activación de canales en ninguno de los parches (n=10) estudiados. Como una alternativa para determinar si la activación de estos canales se podría atribuir a la acción del AMPC en una vía de segundos mensajeros que finalizara en la fosforilación del canal y por ende en su activación, se utilizó un inhibidor general de proteínas cinasas llamado H7 (1-5-isoquinolinilsulfonil-2-metilpiperazina). Este compuesto inhibe a la proteína cinasa dependiente de AMPC (PKA), la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) y a la proteína cinasa C (PKC), a concentraciones  $< 10$   $\mu$ M

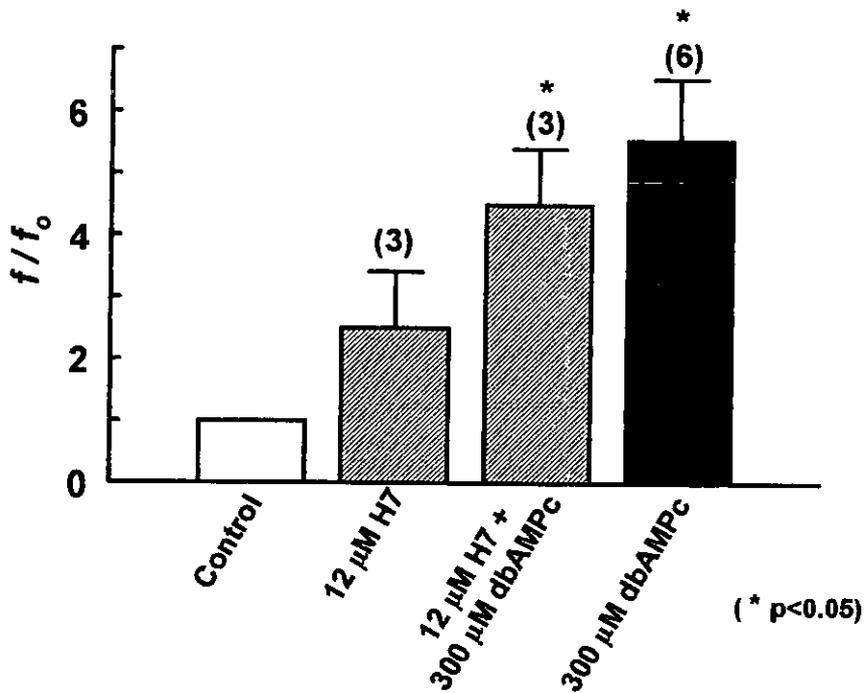
(Kawamoto e Hidaka, 1984). En la Figura 19 se observa que 12  $\mu\text{M}$  H7 no fue capaz de inhibir la activación por dbAMPc de los canales registrados. Por el contrario, el H7 produjo un incremento que no es estadísticamente significativo en la  $P_o$  del canal. El pequeño incremento observado podría deberse a que el canal también se modula por fosforilación, aumentando su actividad al desfosforilarse.

Se ha reportado que el canal SpHCN se bloquea por  $\text{Cs}^+$  extracelular con una  $\text{IC}_{50}$  de 245  $\mu\text{M}$  (Gauss *et al*, 1998) y que el canal de  $\text{K}^+$  modulado por AMPc caracterizado en bicapas se bloquea por  $\text{TEA}^+$  y  $\text{Ba}^{2+}$  a concentraciones milimolares (Labarca *et al*, 1996). Aunque la configuración de célula unida no es la más adecuada para realizar experimentos de farmacología de los canales utilizando compuestos no permeables, por último se decidió estudiar el bloqueo de este canal, incluyendo  $\text{Cs}^+$  en la solución de la pipeta. Sin embargo, en estos experimentos no se logró observar que el  $\text{Cs}^+$  bloqueara al canal. Este resultado podría sugerir que el canal registrado en este trabajo no corresponde al canal SpHCN. Sin embargo, cabe la posibilidad que el canal clonado, al ser expresado en un sistema heterólogo, exhiba propiedades distintas al canal nativo en el espermatozoide.



**Figura 18. Modulación del canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar por IBMX.**

**A.** Trazos representativos de la actividad de canales unitarios en estado estacionario en parches en célula unida en condiciones Control y en presencia de 100  $\mu$ M de IBMX, 300  $\mu$ M de dbAMPc ó de 100  $\mu$ M de IBMX + 300  $\mu$ M de dbAMPc. El registro de las corrientes unitarias se realizó como se menciona en *Materiales y Métodos*. Los saltos discretos hacia abajo indican la apertura del canal (O) desde el estado cerrado (C). **B.** Resumen de los experimentos realizados en las condiciones mencionadas en A. Cada barra representa la relación  $f/f_0$ , donde  $f$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto en presencia del compuesto a probar y  $f_0$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto en ausencia de tratamiento. Las barras de error representan  $\pm$  ES. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra.



**Figura 19. La modulación por AMPc del canal catiónico de espermatozoides del erizo de mar no parece ser por fosforilación.**

El H7 produce un aumento no significativo en la  $P_o$  del canal y no afecta el incremento de la  $P_o$  inducido por el dbAMPC. Cada barra representa la relación  $f/f_0$ , donde  $f$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto en presencia del compuesto a probar y  $f_0$  es la fracción de tiempo que el canal permanece en el estado abierto en ausencia de tratamiento. Las barras de error representan  $\pm$  ES. El número de experimentos se indica entre paréntesis en la parte superior de cada barra.

## V. DISCUSIÓN

El espermatozoide del erizo de mar posee un amplio repertorio de canales iónicos que participan en la respuesta fisiológica a los componentes de la matriz extracelular del óvulo (Darszon *et al*, 1999). La participación de los canales iónicos en la fisiología del espermatozoide se ha estudiado principalmente utilizando técnicas bioquímicas, como el uso de colorantes fluorescentes sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , pH y Em y/o la reconstitución de vesículas de membrana del espermatozoide en experimentos de bicapas lipídicas planas (Darszon, *et al*, 1999).

La caracterización de los canales iónicos directamente del espermatozoide ha probado ser en extremo difícil (Guerrero *et al*, 1987). Para poder sortear estas dificultades y ser capaces de hacer registros de *patch-clamp* se recurrió al hinchamiento de las células utilizando agua de mar diluida. Esta estrategia permitió incrementar el éxito en la formación de gigasellos para llevar al cabo nuestros experimentos. Anteriormente, esta misma estrategia hizo posible la detección de un canal de  $\text{K}^+$  de 2-5 pS del espermatozoide de erizo de mar que se activa por el Speract (Babcock *et al*, 1992). Aprovechando esta técnica en el presente trabajo se pudo registrar y caracterizar directamente nuevos tipos de canales iónicos que se piensa son activados por el Speract en la membrana plasmática del espermatozoide del erizo de mar.

### A. Canales activados por el Speract.

El espermatozoide hinchado mantiene su homeostasis celular y la capacidad de responder al Speract (Reynaud *et al*, 1993, Babcock *et al*, 1992). La activación de diferentes canales iónicos del espermatozoide del erizo de mar por el péptido da lugar a los cambios en el

potencial de membrana. De hecho, se ha propuesto que es un canal de  $K^+$  activado directamente por el GMPc el que produce la hiperpolarización inducida por el Speract (Babcock *et al*, 1992, Galindo *et al*, 2000). Sin embargo, después de la hiperpolarización inicial, la membrana celular pronto se repolariza e incluso se depolariza debido principalmente a la entrada de  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ . Actualmente se piensa que la hiperpolarización y el incremento en la [AMPC] podrían activar un canal catiónico modulado por AMPc que permitiría la entrada de  $Na^+$  a la célula, contribuyendo a la repolarización y depolarización de la membrana. (Labarca *et al*, 1996, Gauss *et al*, 1998).

En los experimentos aquí mostrados, es claro que la aplicación de Speract a una concentración saturante (100 nM) a un espermatozoide hinchado sometido a *patch-clamp* en la configuración de célula unida produce la activación de diferentes canales iónicos. Sin embargo, en el análisis de los registros fue difícil determinar que canales se activaron debido a la presencia de múltiples conductancias en un mismo parche. Aun así, se logró determinar algunas conductancias presentes en estos parches antes y después de la aplicación del Speract (Tabla I). Considerando las condiciones de registro de estos experimentos, las conductancias observadas corresponden principalmente a canales catiónicos. Estos canales se pueden agrupar en tres grupos principales de acuerdo al valor de su conductancia. Las conductancias de 8 y 10 pS podrían corresponder al canal de  $K^+$  de 5 pS que se activa por Speract y que ha sido previamente reportado por Babcock y sus colaboradores (1992). Las conductancias en el rango de 14 a 17 pS podrían corresponder al canal activado por GMPc caracterizado en este trabajo, mientras que las conductancias de 27 a 47 pS pudieran corresponder más probablemente a las conductancias del canal modulado por AMPc que se ha investigado también durante el desarrollo de esta tesis. La participación de estos dos canales en la respuesta al Speract se

discutirá mas adelante.

### **B. Canal de $K^+$ activado por GMPc.**

La concentración de GMPc intracelular en el espermatozoide aumenta debido a la activación transitoria de la guanilato ciclasa, una vez que el Speract se ha unido a su receptor (Garbers, 1989, Yuen y Garbers, 1992). Durante la respuesta al Speract, el primer cambio que se observa en el Em es una hiperpolarización, la cual se puede inhibir al incrementar la  $[K^+]_o$  externo. Esta maniobra no inhibe el aumento en la  $[GMPc]_i$  (Darszon et al, 1999), por lo que se ha propuesto que el GMPc pudiera activar directamente una conductancia que permite la salida de  $K^+$ , que es la que daría lugar a esa hiperpolarización (Babcock *et al*, 1992; Galindo *et al*, 2000). Sin embargo, no se ha demostrado todavía la activación directa por GMPc de canales de  $K^+$  en los espermatozoides del erizo de mar.

En este trabajo caracterizamos un canal modulado por GMPc en espermatozoides hinchados del erizo de mar. Este canal presenta una conductancia unitaria de 15 pS y es muy selectivo a  $K^+$  ( $P_K/P_{Na} = 68$ ). En experimentos de parches escindidos demostramos que el canal se activa directamente por GMPc, mientras que en experimentos de célula unida se observó que el canal puede ser activado por el 8BrGMPc. Asimismo, el canal se bloquea por DCB, un bloqueador de canales CNG. Interesantemente, la activación del canal directamente por GMPc en condiciones fisiológicas, podría permitir la salida de  $K^+$  de la célula resultando en la hiperpolarización antes mencionada.

Los canales CNG son elementos esenciales de diferentes sistemas de fototransducción en los cuales el GMPc es el componente principal de la cascada de señalización intracelular. Normalmente los canales CNG son poco selectivos a cationes, presentan una permeabilidad

relativamente alta a  $\text{Ca}^{2+}$ , su apertura tiende a depolarizar a la célula y a elevar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Zimmerman, 1995). Sin embargo, se han caracterizado algunos canales activados por GMPc que muestran una alta selectividad a  $\text{K}^+$  y que al activarse hiperpolarizan a las células (Finn *et al*, 1997). Un ejemplo de ello son los canales responsables de la hiperpolarización inducida por la luz en los fotorreceptores ciliares de moluscos bivalvos (Gottow *et al*, 1994, Gómez y Nasi, 1995, 1997) y en las neuronas fotosensibles extraoculares del ganglio abdominal del molusco *Onchidium verrunculatum* (Gottow *et al*, 1994).

Los canales de los fotorreceptores ciliares de molusco se bloquean por DCB ( $\text{IC}_{50}$  5  $\mu\text{M}$ ) (Gómez y Nasi, 1997). De igual forma este compuesto bloquea la hiperpolarización inducida por Speract y 8Br-GMPc en vesículas de flagelo (Galindo *et al*, 2000). El canal de 15 pS que registramos en el espermatozoide del erizo de mar también se bloquea por DCB, aún cuando solo pudimos probar concentraciones más altas (25  $\mu\text{M}$ ).

Anteriormente se había reportado que el Speract activaba un canal selectivo a  $\text{K}^+$  con una conductancia unitaria de aproximadamente 5 pS (Babcock *et al*, 1992). Por el momento es difícil correlacionar directamente al canal de  $\text{K}^+$  de 15 pS reportado aquí con el canal de  $\text{K}^+$  de 5 pS, debido principalmente debido a la diferencia en los valores de conductancia. Sin embargo, el canal de  $\text{K}^+$  de 5 pS se caracterizó en condiciones experimentales donde se tenían cationes divalentes en la solución de la pipeta (Babcock *et al*, 1992). De esta manera, el canal caracterizado en este trabajo tendría una conductancia significativamente menor en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en la pipeta.

Como se ha visto, los canales modulados por nucleótidos cíclicos tienen una participación importante en la fisiología del espermatozoide del erizo de mar, sin embargo aun no se ha logrado caracterizar la contraparte molecular del canal de  $\text{K}^+$  activado por GMPc. Aun así, en

el espermatozoide del bovino se ha descrito un canal modulado por GMPc que es similar a los canales de los conos en la retina de los mamíferos (Weyand *et al*, 1994). Aunque este canal se identificó inicialmente en el espermatozoide de toro, aun no se sabe cuál podría ser su papel fisiológico y si participa o no en eventos relacionados con la fecundación. Estudios más recientes han propuesto que podría permitir la entrada de  $Ca^{2+}$  y de esta manera participar en la regulación del movimiento del flagelo (Wiesner *et al*, 1998).

### C. Canales activados por el AMPc.

La adenilato ciclasa del espermatozoide se estimula por la hiperpolarización y por aumentos en el  $pH_i$  y la  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por el Speract (Beltrán *et al*, 1996). En este trabajo se caracterizaron dos conductancias (de 31 y 43 pS) moduladas por AMPc. Ambas conductancias tienen propiedades similares, son selectivas a cationes ( $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 3$ ), tienen una baja probabilidad de apertura, son ligeramente dependientes de voltaje dependiente y se activan por análogos permeables del AMPc e IBMX. Prácticamente nunca se observó a ambas conductancias en el mismo registro, pero por sus propiedades biofísicas se piensa que un canal con dos subestados de conductancia podría ser el responsable de ellas.

La presencia de dos conductancias diferentes podría asociarse a distintos estados de fosforilación de un mismo canal. Se sabe que los canales iónicos, de igual forma que muchas otras proteínas, son susceptibles de ser fosforilados y en muchos casos el estado de fosforilación modula al canal de múltiples formas (Levitan, 1994). Por ejemplo, en los canales de  $K^+$  sensibles a ATP del hipotálamo, el estado de fosforilación del canal modula directamente su actividad incrementando la corriente promedio cuando se encuentra fosforilado (Routh *et al*, 1997). El canal SpHCN presenta múltiples sitios consenso de

fosforilación para proteínas cinasas A, C, G y cinasas de residuos de tirosina, y de hecho, este canal en el espermatozoide se encuentra fosforilado (Gauss *et al*, 1998). Para corroborar esto, sería necesario realizar un estudio detallado de las propiedades de este canal, utilizando diversas fosfatasas e inhibidores de proteínas cinasas, para determinar con exactitud si el estado de fosforilación del canal determina la presencia de los dos subestados de conductancia.

Otra posible explicación de la presencia de estas dos conductancias tan similares sería que el canal estuviera siendo modulado por diferentes subunidades accesorias y que esta modulación dependiera de su localización subcelular, confiriéndole así cierta variabilidad en la conductancia. Los canales CNG, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes y los canales activados por ligando (receptor nicotínico, receptor de GABA, etc.) entre otros, están formados por diferentes subunidades que les confieren propiedades específicas. Por ejemplo, los canales CNG están constituidos por dos diferentes subunidades con una estequiometría no determinada hasta el momento (Zagotta y Siegelbaum 1996). La subunidad  $\alpha$  por sí sola forma canales funcionales cuando se expresa heterológicamente, mientras que la subunidad  $\beta$  no produce canales funcionales por sí misma. Sin embargo, la subunidad  $\beta$  confiere propiedades específicas al canal nativo, como son el bloqueo por L-cis-diltiazem, la activación en forma fluctuante conocida como “flickering” (Chen *et al*, 1993) y la modulación por  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina (Hsu y Molday 1993, Chen *et al*, 1994).

En nuestros experimentos observamos que los dos análogos permeables del AMPc que se utilizaron, el dbAMPc y el 8BrAMPc, son igualmente efectivos para activar al canal catiónico. Se ha reportado que el 8BrGMPc es un buen activador de los canales CNG, siendo aun más potente que el propio GMPc (Koch y Kaupp 1985). En cambio, los análogos del GMPc que

están modificados en la ribosa, en la porción fosfodiéster o pirimídica de la molécula, como es el dibutilil-GMPc (dbGMPc), no son efectivos como agonistas de los canales CNG (Koch y Kaupp 1985). Este reporte difiere con lo observado en nuestros experimentos. Sin embargo, tanto el dbAMPc como el 8BrAMPc se han utilizado de manera efectiva para sustituir al AMPc en diversos estudios fisiológicos que involucran la actividad de canales iónicos y transportadores en diferentes modelos experimentales (Burton *et al*, 2000, Su *et al*, 2000, Dagenais *et al*, 2001, Fleischhauer, *et al*, 2001).

De los canales activados por el Speract que se estudiaron en este trabajo, el de 47 pS presenta propiedades similares al canal modulado por AMPc también caracterizado aquí. La conductancia unitaria de ambos canales difiere solamente en unos cuantos pS (47 y 43 pS, respectivamente). Con base en este resultado se podría pensar que el canal modulado por el dbAMPc, también se activa durante la cascada de señalización iniciada en respuesta al Speract.

El canal modulado por AMPc presentado en este trabajo es similar al canal de K<sup>+</sup> regulado por AMPc que se caracterizó en bicapas planas donde se fusionaron vesículas de membranas de flagelo purificadas de espermatozoides de *S. purpuratus* (Labarca *et al*, 1996). La cinética y selectividad ( $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 4$ ) de ambos canales son prácticamente indistinguibles. No obstante, las conductancias unitarias observada en nuestros registros son significativamente menores que la conductancia de 103 pS del canal caracterizado en las bicapas. La diferencia en los valores de conductancia se puede explicar al menos en parte, debido a que las condiciones de registro utilizadas en los experimentos de bicapas planas son muy distintas a las utilizadas en los experimentos de *patch-clamp* en célula unida.

Como ya se mencionó anteriormente el canal SpHCN fue el primer canal clonado del

espermatozoide de erizo de mar (Gauss *et al*, 1998) y pertenece a la familia de canales HCN. Esta familia comprende a los canales del marcapasos que controlan el latido cardiaco y el disparo rítmico de neuronas individuales (Gauss y Seifert, 2000, Kaupp y Seiffert, 2001). El SpHCN es pobremente selectivo a  $K^+$ , se activa por hiperpolarización y por la unión directa de AMPc. Comparte varias características con el canal estudiado en bicapas y con el caracterizado en este trabajo. Es solamente 4 veces más permeable a  $K^+$  que a  $Na^+$ , el AMPc incrementa la corriente macroscópica, pero el GMPc muy poco. En ausencia de AMPc, la corriente macroscópica no se inactiva, mientras que en presencia del nucleótido se convierte en inactivante. Los canales catiónicos que registramos en nuestros experimentos de *patch clamp* no se inactivan, pudiéndose pensar que existe una concentración basal de AMPc en el citoplasma suficiente para producir este efecto en los canales que registramos.

A pesar de que ya se han clonado 4 diferentes subunidades de la familia de canales HCN en el mamífero y se conocen 3 subunidades más clonadas de diferentes invertebrados, la caracterización de las propiedades de estos canales al nivel unitario a sido muy pobre. Solamente el canal HvHCN se ha estudiado a este nivel. El canal HvHCN se clonó de las antenas de la polilla del gusano de seda. Este es selectivo para cationes, presenta una  $P_{K^+}/P_{Na^+}$  de  $\sim 3$ , y su conductancia unitaria es de 30 pS (Krieger *et al*, 1999). Estas propiedades concuerdan con las del canal caracterizado en este trabajo.

Por otro lado, el H7, un antagonista de múltiples proteínas cinasas, no inhibió la activación de este canal por el dbAMPc. Aunque estos experimentos apoyarían la idea de que el canal se activa directamente por el nucleótido cíclico, este hecho no es totalmente concluyente. Como ya se mencionó, este canal catiónico podría relacionarse con el canal SpHCN y el caracterizado en los experimentos de bicapas, en ambos casos se demostró que el AMPc puede

activar a estos canales de forma directa (Gauss *et al*, 1998, Labarca *et al*, 1996). Sin embargo, es necesario probar la activación directa por AMPc del canal catiónico que se registró aquí utilizando parches escindidos.

Tomando en conjunto la información de que el canal catiónico descrito en este trabajo presenta una ligera dependencia al voltaje, incrementándose su  $P_o$  a potenciales hiperpolarizantes y que tanto el canal caracterizado en bicapas como el canal SpHCN, también se activan por la hiperpolarización de la membrana plasmática, se podría pensar que en condiciones fisiológicas este canal se puede activar por la hiperpolarización y por el incremento en la [AMPc] que ocurren durante la respuesta al Speract. Considerando que este canal presenta una  $P_{K^+}/P_{Na^+}$  de  $\sim 3$ , al abrirse en condiciones fisiológicas, donde el agua de mar tiene una alta concentración de NaCl ( $\sim 0.5$  M), permitiría la entrada de  $Na^+$  y depolarizaría a la célula. De esta forma, un canal con estas propiedades contribuiría a la repolarización del Em del espermatozoide, posterior a la hiperpolarización inducida por el Speract y explicaría la dependencia que presenta este evento con respecto a la concentración de  $Na^+$  extracelular (Reynaud *et al*, 1993). De la misma forma, este papel fisiológico se le ha atribuido al canal SpHCN y al canal estudiado en las bicapas, ya que se ha visto que presentan propiedades biofísicas similares (Gauss *et al*, 1998, Labarca *et al*, 1996).

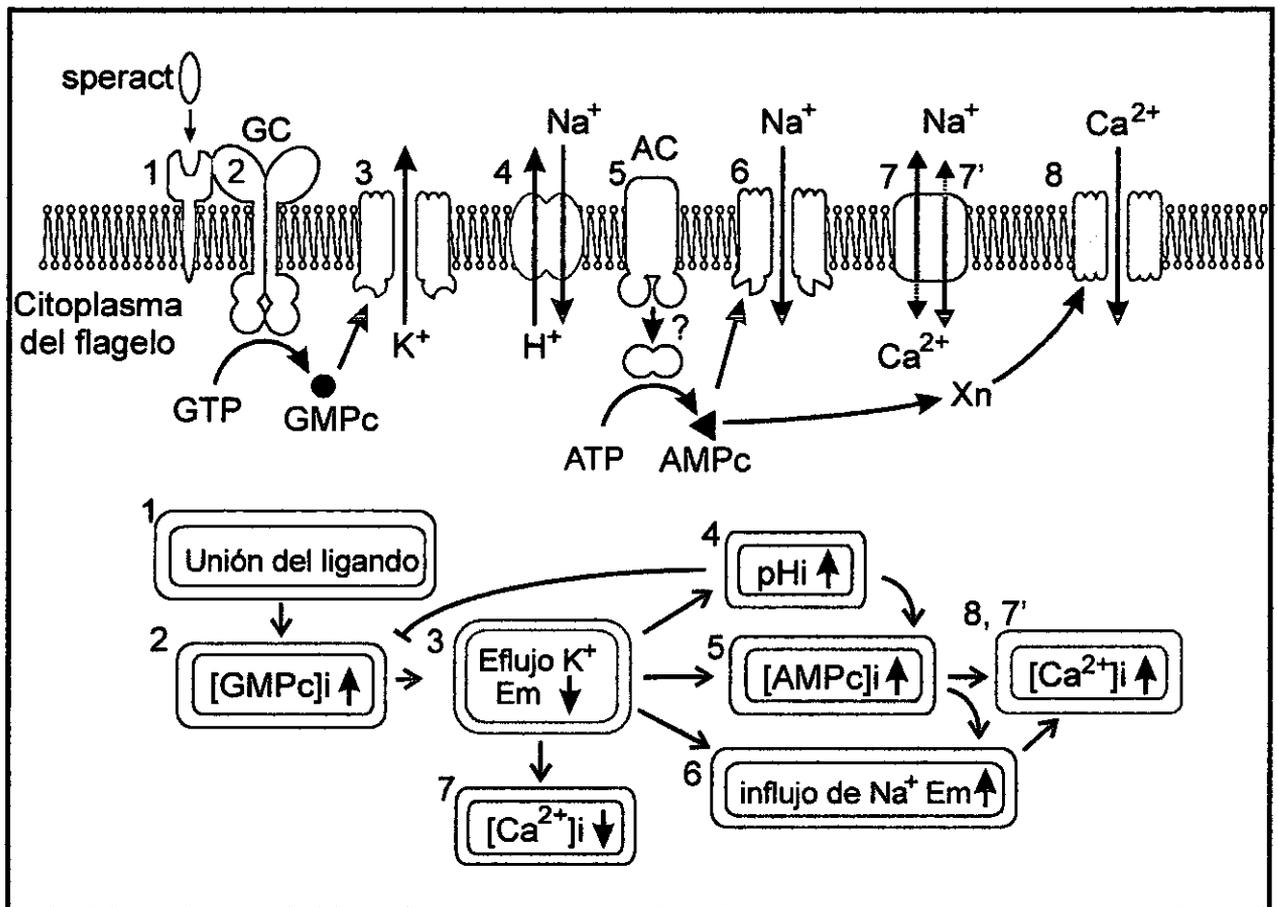
El canal SpHCN se localizó principalmente en el flagelo del espermatozoide de ambas especies de erizo de mar, *S. purpuratus* (Gauss *et al*, 1998) y *L. pictus* (este trabajo). Los canales HCN participan en procesos de periodicidad tanto en el corazón como en ciertos grupos neuronales (Clapham 1998) y se piensa que el canal SpHCN podría participar en la modulación del movimiento del flagelo (Gauss y Seifert 2000), aunque hasta el momento no se ha propuesto el mecanismo por el cual lo hacen.

Se sabe que el incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  altera la motilidad del espermatozoide (Ward et al, 1985, Cook et al 1994) y que este incremento en el  $Ca^{2+}$  se debe a la activación de canales de  $Ca^{2+}$  en la membrana plasmática (Reynaud *et al*, 1993). Como ya se mencionó anteriormente, el canal SpHCN bien podría repolarizar y/o depolarizar la membrana induciendo tal vez, la activación de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$ . Dos hechos recientes apoyan esta idea, el primero es que durante su última estancia sabática, el Dr. Alberto Darszon utilizando sondas fluorescentes sensibles a la  $[Ca^{2+}]_i$  encontró que en el espermatozoide del erizo de mar que el Speract induce oscilaciones en la  $[Ca^{2+}]_i$ . Estas oscilaciones se pueden bloquear en parte por inhibidores específicos de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, tales como el  $Ni^{2+}$  y las dihidropiridinas, proponiendo que al menos un canal de  $Ca^{2+}$  dependiente de voltaje participa en la entrada de  $Ca^{2+}$ . El segundo hecho es que recientemente se publicó la clonación de un canal catiónico, que tiene una estructura similar a los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje dependiente y que se expresa específicamente en el flagelo del espermatozoide de ratón (Ren *et al*, 2001). El bloqueo de la expresión del gen que codifica para este canal produce ratones que no son fértiles debido a que se afecta la motilidad del espermatozoide. Aunque la caracterización biofísica de este canal no se ha realizado aun, se ha propuesto que es el responsable de la entrada de  $Ca^{2+}$  que modula el movimiento del flagelo (Ren *et al*, 2001).

#### **D. Modelo de los eventos iónicos durante la respuesta al Speract.**

En la Figura 20 se muestra un modelo de eventos durante la respuesta al Speract donde se integra la información que se tiene acerca de la participación de los diferentes canales iónicos caracterizados en este trabajo. La unión del Speract a su receptor, una proteína de 77 KDa (1)

que se localiza a todo lo largo del flagelo del espermatozoide (Dangott y Garbers, 1984), activa la guanilato ciclasa (GC), produciendo un incremento en la  $[GMPc]_i$  (2) (Bentley *et al.*, 1988). El GMPc activa directamente al canal altamente selectivo a  $K^+$  de 15 pS (3) caracterizado en este trabajo, permitiendo el eflujo del  $K^+$  de la célula, que resulta en una hiperpolarización de la membrana (Babcock *et al.*, 1992; Galindo *et al.*, 2000). Esta hiperpolarización modula diferentes efectores en la célula dependientes de voltaje transmembranal y puede además aumentar el intercambio  $Na^+/Ca^{2+}$  que mantiene una baja  $[Ca^{2+}]_i$  (7) (Bridge, 2001) e incrementa el  $pHi$  al activar un intercambio  $Na^+/H^+$  (4) (Lee y Garbers, 1986). La adenilato ciclasa (AC) (5) se activa en respuesta tanto a la hiperpolarización como a la alcalinización, produciendo un incremento en la  $[AMPc]$  (Beltrán *et al.*, 1996). La hiperpolarización y el AMPc activan al canal catiónico modulado por AMPc caracterizado en este trabajo que podría corresponder al canal SpHCN (6) (Gauss *et al.*, 1998). La activación de un canal de este tipo permitiría un influjo de  $Na^+$  a la célula y contribuiría a la repolarización y depolarización de la membrana. Por otro lado, se sabe que la  $[Ca^{2+}]_i$  es muy importante para la regulación del movimiento del flagelo, aun así, es poco lo que se sabe sobre su regulación durante la respuesta al Spermact. Se ha propuesto que un intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ , que trabajaría en sentido inverso (7'), podría participar en el incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  durante la respuesta al Spermact (Schackmann y Chock, 1986). Adicionalmente la depolarización inducida por el Spermact es dependiente del  $Ca^{2+}$  externo y del incremento en la  $[AMPc]$ . La repolarización de la membrana producida por la entrada de  $Na^+$  podría estar modulando a un canal de  $Ca^{2+}$  regulado por AMPc (8), el cual a su vez contribuiría a la entrada de este catión, que junto con el influjo de  $Na^+$ , depolarizarían a la célula (Cook y Babcock, 1993a).



**Figura 20. Modelo propuesto de los eventos principales durante la respuesta al Speract en el flagelo de espermatozoide del erizo de mar.**  
(ver descripción en el texto).

## VI. CONCLUSIONES

El Speract activa diferentes canales iónicos en el espermatozoide hinchado de erizos de mar de las especies *S. purpuratus* y *L. pictus*.

Se caracterizó un canal de  $K^+$  de 15 pS que se activa directamente por GMPc y que es bloqueado por DCB. Este canal es un buen candidato para producir la hiperpolarización inducida por el Speract.

Se caracterizaron también dos conductancias, de 31 y 43 pS, que por sus características biofísicas tan similares entre ellas, se piensa que son en realidad un mismo canal iónico con dos estados de conductancia. Este canal es selectivo a cationes monovalentes y se modula por dbAMPc e IBMX. Es posible además que el AMPc module directamente a este canal ya que el H7 no inhibió la activación por el dbAMPc. En condiciones fisiológicas este canal podría participar en la repolarización y depolarización posteriores a la hiperpolarización inducida por el Speract.

Por último se observó que el Speract activa diferentes conductancias iónicas, entre las cuales se encuentran algunas similares a las activadas por GMPc (15 pS) y otras como las del canal catiónico modulado por AMPc (31 y 43 pS).

## VII. PERSPECTIVAS

Existen aun muchas preguntas por contestar acerca de la participación de los canales iónicos en la fisiología del espermatozoide. Desconocemos no solo sobre la identidad de los canales que participan en la respuesta al Speract, si no también sobre aquellos que participan en la motilidad y los que son responsables de los cambios iónicos durante la reacción acrosomal.

En este trabajo nos enfocamos en la caracterización de solo algunos de los canales iónicos del espermatozoide. En específico estudiamos los modulados por nucleótidos cíclicos, pero aún quedan bastantes preguntas por contestar acerca de estos canales. Es necesario determinar de manera irrefutable si estos canales son activados directamente o indirectamente por nucleótido cíclicos. Asimismo, sería de mucho interés el realizar una caracterización farmacológica completa utilizando una batería amplia de diferentes bloqueadores de canales iónicos.

La técnica de *patch clamp* en la configuración de célula unida no permite realizar una caracterización farmacológica completa de los canales iónicos presentados aquí y de las posibles vías de segundos mensajeros que los regulan. Esto se debe a que esta configuración requiere de la utilización de compuestos permeables a la membrana plasmática. Sin embargo, recientemente han surgido algunas alternativas que podrían facilitar este trabajo. Al igual que en el mamífero, se podría utilizar a las células espermatogénicas del erizo de mar. Estas son las células de la línea germinal que se diferencian y dan lugar al espermatozoide. Las ventajas que proporcionan las células espermatogénicas esta el que su tamaño es mucho mayor, permitiendo la realización de registros en la configuración de célula completa. Por otra parte,

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Publishing, Inc., New York. 1994.
- Babcock, D. F., Bosma, M. M, Battaglia, D. E. y Darszon, A. (1992). Early persistent activation of sperm K<sup>+</sup> channels by the egg peptide Speract. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89, 6001-6005.
- Beltrán, C., Darszon, A., Labarca, P. y Lievano, A. (1994). A high-conductance voltage-dependent multistate Ca<sup>2+</sup> channel found in sea urchin and mouse spermatozoa. *FEBS Lett.* 338, 23-26.
- Beltrán, C., Zapata, O. y Darszon, A. (1996). Membrane potencial regulates sea urchin sperm adenylyl cyclase. *Biochemistry* 35: 7591-7598.
- Bentley, J. K., Khatra, A. S., y Garbers, D. L. (1988) Receptor-mediated activation of detergent-solubilized guanylate cyclase. *Biol. Reprod.* 39, 639-647.
- Biel M., Ludwig A., Zong X. y Hofmann F. (1999) Hyperpolarization-activated cation channels: a multi-gene family. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 136, 165-181.
- Bonigk, W., Bradley, J., Muller, F., Sesti, F., Boekhoff, I., Ronnett, G. V., Kaupp, U. B. y Frings, S. (1999). The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* 19, 5332-5347.
- Broillet, M. C. y Firestein, S. (1999). Cyclic nucleotide-gated channels: molecular mechanism of activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 730-742.
- Burton, T. J., Elneil, S., Nelson, C. P. y Ferguson, D. R. (2000) Activation of epithelial Na<sup>+</sup> channel activity in the rabbit urinary bladder by cAMP. *Euro J. Pharmacol.* 404, 273-280.
- Cardullo, R. A., Herrick, S. B., Peterson, M. J. y Dangott, L. J. (1994). Speract receptors are localized on sea urchin sperm flagella using a fluorescent peptide analog. *Dev. Biol.* 162, 600-607.
- Chen, T. Y., Peng, Y. W., Dhallan, R. S., Ahamed, B., Reed, R. R. y Yau, K. W. (1993). A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362 764-767
- Chen, T. Y., Illing, M., Molday, L. L., Hsu, Y. T., Yau, K. W. y Molday, R. S. (1994). Subunit 2 (or beta) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca<sup>2+</sup>-calmodulin modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11757-11761.
- Clapham, D. E. (1998) Not so funny anymore: pacing channels are cloned. *Neuron* 21, 5-7.

- Cook, S. P. y Babcock, D. F. (1993a). Activation of  $\text{Ca}^{2+}$  permeability by cAMP is coordinated through the pHi increase induced by Speract. *J Biol Chem* **268**, 22408-22413.
- Cook, S.P. y Babcock, D.F. (1993b). Selective modulation by cGMP of the  $\text{K}^+$  channel activated by Speract. *J Biol Chem* **268**, 22402-22407.
- Dagenais, A., Christine-Denis, M. F., Vives, S., Girouard, C. M., Thao, N., Toshiyuki, Y., Czeslawa, G., Rashmi K. y Berthiaume, Y. (2001). Modulation of  $\alpha$ -ENaC and  $\alpha_1$ - $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **281**, L217-L230,
- Dangott, L. J. y Garbers, D. L. (1984). Identification and partial characterization of the receptor for Speract. *J Biol Chem* **259**, 13712-13716.
- Dangott, L. J., Jordan, J. E., Bellet, R. A. y Garbers, D. L. (1989). Cloning of the mRNA for the protein that crosslinks to the egg peptide Speract. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **86**, 2128-2132.
- Darszon, A., Guerrero, A., Liévano, A., González-Martínez, M. y Morales, E. (1988). Ionic channels in sea urchin sperm physiology. *NIPS* **3**, 181-185
- Darszon, A., Labarca, P., Beltrán, C., García-Soto, J. y Liévano, A. (1994). Sea Urchin Sperm: An Ion Channel Reconstitution Study Case. *Methods: a companion to Methods in Enzimology.* **6**, 37-50.
- Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. y Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol. Rev.* **79**, 481-510.
- Darszon, A., Liévano, A. y Beltrán, C. (1996). Ion channels: key elements in gamete signaling. In: Current Topics in Developmental Biology. (Ed. Pedersen, R.A. y Schatten G.P.). **34** 117-167.
- Dempster, J. (1993) Analysis of ionic current fluctuations: noise analysis. En: Computer analysis of electrophysiological signals. Academic Press, London. 191-203.
- DiFrancesco, D. (1993). Pacemaker mechanism in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 455-472.
- Domino, S. E. y Garbers, D. L. (1988). The fucose-sulfate glycoconjugate that induces an acrosome reaction in spermatozoa stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation. *J. Biol. Chem.* **263**, 690-695.
- Dzeja, C., Hagen, V., Kaupp, U. B., y Frings, S. (1999),  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO J.* **18**, 131-144.

- Espinosa, F., López-González, I., Serrano, C. J., Gasque, G., de la Vega-Beltrán, J. L., Treviño, C. L. y Darszon, A. (1999). Anion channel blockers differentially affect T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents of mouse spermatogenic cells,  $\alpha 1\text{E}$  currents expressed in *Xenopus* oocytes and the sperm acrosome reaction. *Dev. Genet.* **25**, 103-114.
- Finn, J. T., Solessio, E. C. y Yau, K. W. (1997). A cGMP-gated cation channel in depolarizing photoreceptors of the lizard parietal eye. *Nature* **385**, 815-819.
- Fleischhauer, J. C., Beny, J. L., Flammer, J. y Haefliger, I. O. (2001). Cyclic AMP and anionic currents in porcine ciliary epithelium. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **218**, 370-372.
- Galindo, B. E., Beltrán, C., Cragoe, Jr. E. J. y Darszon, A. (2000). Participation of a  $\text{K}^+$  channel modulated directly by cGMP in the Speract-induced signaling cascade of *Strongylocentrotus purpuratus* sea urchin sperm. *Dev. Biol.* **221**, 285-294.
- Garbers, D. L. (1989). Molecular basis of fertilization. *Annu Rev Biochem.* **58**, 719-742.
- Gauss, R. y Seifert, R. (2000). Pacemaker oscillations in heart and brain: a key role for hyperpolarization-activated cation channels. *Chronobiol.Int.* **17**, 453-469.
- Gauss, R., Seifert, R. y Kaupp, U. B. (1998). Molecular Identification of a hiperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**, 583-587.
- Gómez, M. P. y Nasi, E. (1995). Activation of light-dependent  $\text{K}^+$  channel in ciliary invertebrate photoreceptors involves cGMP but not the  $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$  cascade. *Neuron* **15**, 607-618.
- Gómez, M. P. y Nasi, E. (1996). Ion permeation through light-activated channels in rhabdomeric photoreceptors: role of divalent cations. *J. Gen. Physiol.* **107**, 715-730.
- Gómez, M. P. y Nasi, E. (1997). Antagonist of the cGMP-gated conductance of vertebrate rods block the photocurrent in scallop ciliary photoreceptors. *J. Physiol. (London)* **15**, 367-378.
- Gotow, T., Nishi, T. y Kijima, H. (1994). Single  $\text{K}^+$  channels closed by light and opened by cyclic GMP in molluscan extra-ocular photoreceptor cells. *Brain Res.* **662**, 268-72.
- Guerrero, A. y Darszon, A. (1989a). Evidence for the activation of two different  $\text{Ca}^{2+}$  channels during the egg jelly-induced acrosome reaction of sea urchin sperm. *J. Biol. Chem.* **264**, 19593-19599.
- Guerrero, A. y Darszon, A. (1989b). Egg jelly triggers a calcium influx which inactivates and is inhibited by calmodulin antagonists in the sea urchin sperm. *Biochim. Biophys. Acta* **980**, 109-116.
- Guerrero, A. Sánchez, J. A. y Darszon, A. (1987). Single-channel activity in sea urchin sperm revealed by the patch-clamp technique. *FEBS Lett.* **220**, 295-298

- Frings, S. (1999). Tuning  $\text{Ca}^{2+}$  permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol.* **113**, 795-797.
- Hackos, D. H. y Korenbrot, J. I. (1999). Divalent cation selectivity is a function of gating in native and recombinant cyclic nucleotide-gated ion channels from retinal photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **113**, 799-817.
- Haynes, L. W., Kay, A. R. y Yau, K. W. (1986). Single cyclic GMP-activated channel activity in excised patches of rod outer segment membrane. *Nature* **321**, 66-70.
- Hille, B. **Ionic channels of excitable membranes**. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates. 1984.
- Hsu, Y. T. y Molday, R. S. (1994). Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. Modulation of activity, affinity purification, and localization. *J. Biol. Chem.* **269**, 29765-29770.
- Idelson, G. H. (2001). HCN family: The pacemaking channels. *Modulator* **15**, 19-21.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L. H., Noma, A. y Ohmori, H. (1999). Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* **274**, 12835-12839.
- Kaupp, U. B. (1995). Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 434-442.
- Kaupp, U. B. (1991). The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *TINS*. **14**, 150-157
- Kaupp, U. B. y Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 235-257.
- Kaupp, U. B., Niidome, T., Tanabe, T., Terada, S., Bonigk, W., Stuhmer, W., Cook, N. J., Kangawa, K., Matsuo, H. y Hirose, T. (1989). Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**, 762-766.
- Kawamoto, S. e Hidaka, H. (1984). 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 258-264.
- Koch, K. W. y Kaupp, U. B. (1985) Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membrane of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**, 6788-6800.
- Korchev, Y. E., Negulyaev, Y. A., Edwards, C. R., Vodyanoy, I., y Lab, M. J. (2000). Functional localization of single active ion channels on the surface of a living cell. *Nat. Cell Biol.* **2**, 616-619.

- Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanhe, W. y Breer, H. (1999). Identification of a cyclic nucleotide- and voltage-activated ion channel from insect antennae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**, 255-267.
- Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Lievano, A. y Darszon, A. (1996). A cAMP regulated K<sup>+</sup>-selective channel from sea urchin sperm. *Dev. Biol.* **174**, 271-280
- Lee, H. y Garbers, D. L. (1986). Modulation of the voltage-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in sea urchin spermatozoa through membrane potential changes induced by the egg peptide Speract. *J Biol Chem.* **262**, 16026-16032
- Lee, H., Johnson, C. y Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with the initiation of motility and the acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol.* **95**, 31-45
- Levitan, I. B. (1994). Modulation of ion channel by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Ann. Rev. Physiol.* **56**, 193-212
- Liévano, A., Sánchez, J. A. y Darszon, A. (1985). Single-channel activity of bilayers derived from sea urchin sperm plasma membranes at the tip of a patch-clamp electrode. *Dev. Biol.* **112**, 253-257.
- Liévano, A., Vega-Saenz de Miera, E. C. y Darszon, A. (1990) Ca<sup>2+</sup> channels from the sea urchin sperm plasma membrane. *J. Gen. Physiol.* **95**, 273-296.
- Longo, F. J. y Anderson, E. (1969). Sperm differentiation in the sea urchins *Arbacia punctulata* and *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Ultrastruct. Res.* **27**, 486-509.
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. y Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* **393**, 587-591.
- Marx, T., Gisselmann, G., Störtkuhl, K. F., Hovermann, V. T. y Hatt, H. (1999). Molecular cloning of putative voltage- and cyclic-nucleotide gated ion channel present in the antennae and eyes of *Drosophila melanogaster*. *Invert. Neurosci.* **4**, 55-63.
- Morales, E., de la Torre, L., Moy, G. W., Vacquier, V. D., y Darszon, A. (1993). Anion channels in the sea urchin sperm plasma membrane. *Mol. Reprod. Dev.* **36**, 174-182.
- Nasi, E. y Gomez, M. P. (1999) Divalent cation interactions with light-dependent K<sup>+</sup> channels: kinetics of voltage-dependent block and requirement for an open pore. *J. Gen. Physiol.* **114**, 653-672
- Nakamura, T. (2000). Cellular and molecular constituents of olfactory sensation in vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **126**, 17-32.
- Nakatani, K. y Yau, K. W. (1988). Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J. Physiol.* **395**, 695-729.

- Nicol, G. D., Kaupp, U. B. y Bownds, M. D. (1987). Transduction persists in rod photoreceptors after depletion of intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.* **89**, 297-319.
- Pape, H. (1996). Queer current and pacemaker: the hiperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev. Physiol.* **58**, 299-327
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson L. C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J. L. y Clapham, D. E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature* **413**, 603-609.
- Reynaud, E., De de la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. y Darszon, A. (1993). Ionic bases of the membrane potential and intracellular pH changes induced by Speract in swollen sea urchin sperm. *FEBS*. **329**, 210-214
- Routh, V. H., McArdle, J. J. Y Levin, B. E. (1997). Phosphorylation modulates the activity of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res.* **778**, 107-119.
- Sakmann, B. y Neher, E., Eds. **Single Channel Recordings**. New York. Plenum Press, 1983
- Sánchez, D., Labarca, P. y Darszon, A. (2001) Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP. *Febs Lett.* **503**, 111-115
- Santoro, B., Liu, D. T., Yao, H., Bartsch, D., Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A. y Tibbs, G. R. (1998). Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* **93**, 717-729.
- Schackman, R. W. y Chock, P. B. (1986). Alteration of intracellular [Ca<sup>2+</sup>] in sea urchin sperm by the egg peptide Speract. *J Biol Chem.* **261**, 8719-8728
- Su, G., Haworth, R. A., Dempsey, J. R. y Sun, D. (2000). Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>2-</sup> cotransporter in primary astrocytes by dibutyryl cAMP and high [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C1710-C1721.
- Suzuki, N. (1995). Structure, Function and Biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool Sci.* **12**, 13-27.
- Trimmer, J. S. y Vacquier, V. D. (1986). Activation of sea urchin gametes. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **2**: 1-26.
- Vacquier, V. D. (1986a). Handling, labeling and fractionating sea urchin spermatozoa. *Methods in Cell Biol.* **27**, 15-40.
- Vacquier, V. D. (1986b). Activation of sea urchin spermatozoa during fertilization. *TIBS* **11**, 77-81.

- Vacquier, V. D. y Moy, G. W. (1997). The fucose sulfates polymer of egg jelly binds to sperm REJ and is the inducer of the sea urchin sperm acrosome reaction. *Dev. Biol.* **192**, 125-135.
- Ward, G. E., Brokaw, C. J., Garbers, D. L. y Vacquier, V. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.* **101**, 2324-2329.
- Ward, G. E., Moy, G. W. y Vacquier, V. (1986). Phosphorylation of membrane bound guanylate cyclase of sea urchin spermatozoa. *J. Cell Biol.* **103**, 95-101.
- Ward, G. R. y Kopf, G. S. (1993). Molecular events mediating sperm activation. *Dev. Biol.* **158**, 9-34.
- Weyand, I., Godde, M., Frings, S., Weiner, J., Muller, F., Altenhofen, W., Hatt, H. y Kaupp U. B. (1994). Cloning and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**, 859-863.
- Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B. y Weyand, I. (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control  $Ca^{2+}$  entry into sperm. *J. Cell Biol.* **142**, 473-484.
- Yau, K. W. (1994). Cyclic nucleotide-gated channels: An expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 3481-3483.
- Yau, K. W. y Baylor, D. A. (1989). Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**, 289-327.
- Yuen, P.S. y Garbers, D.L. (1992). Guanylyl cyclase-linked receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**, 193-225.
- Zagotta, W. N. y Siegelbaum, S. A. (1996). structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu Rev. Neurosci.* **19**, 235-263.
- Zimmerman, A. (1995). Cyclic nucleotide gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 296-303

## VIII. APÉNDICE

### **Artículo publicado:**

Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP.

Daniel Sánchez, Pedro Labarca y Alberto Darszon.

*FEBS Letters* (2001) **503**, 111-115.

## Sea urchin sperm cation-selective channels directly modulated by cAMP

Daniel Sánchez<sup>a</sup>, Pedro Labarca<sup>b</sup>, Alberto Darszon<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250, Mexico<sup>b</sup>Centro de Estudios Científicos, Valdivia, Chile

Received 25 June 2001; accepted 11 July 2001

First published online 26 July 2001

Edited by Maurice Montal

**Abstract** Components of the sea urchin outer egg jelly layer such as speract drastically change second messenger levels and membrane permeability in sperm. Ion channels are deeply involved in the sperm–egg dialogue in sea urchin and other species. Yet, due to the small size of sperm, studies of ion channels and their modulation by second messengers in sperm are scarce. In this report we offer the first direct evidence that cation-selective channels upwardly regulated by cAMP operate in sea urchin sperm. Due to their poor selectivity among monovalent cations, channel activation in seawater could contribute to sperm membrane repolarization during the speract response. © 2001 Published by Elsevier Science B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

**Key words:** Speract; cAMP; Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel; Sperm; Sea urchin

## 1. Introduction

The dialogue between sea urchin gametes is initiated by small peptides from the egg jelly layer. Speract, a decapeptide (Gly-Phe-Asp-Leu-Asn-Gly-Gly-Gly-Val-Gly) isolated from the *Hemicentrotus pulcherrimus* [1], *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus pictus* [2] egg jelly, induces complex sperm plasma membrane ion permeability changes. Upon binding to its receptor, speract transiently activates a membrane guanylate cyclase increasing cGMP [3,4] and temporarily hyperpolarizes sperm. K<sup>+</sup> channels have been proposed to mediate this hyperpolarization [5–7], which stimulates Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange [5] increasing intracellular pH (pH<sub>i</sub>). Thereafter, the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) is also transiently elevated causing sperm to depolarize [8]. Speract also stimu-

lates a sea urchin sperm membrane adenylate cyclase that is modulated by pH<sub>i</sub>, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and membrane potential [9–12].

Sea urchin sperm are quite small (~2 μm head diameter) and thus very difficult to patch clamp [13]. Swelling them in diluted seawater facilitates patching and sperm ion channel study. Swollen sperm preserve their [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, pH<sub>i</sub> and E<sub>m</sub> regulation and their response to speract [6].

Previous evidence suggested the presence of cation-selective channels activated directly by cAMP in sea urchin sperm [14,15]. Here, we report the first direct recording of cation-selective channels upwardly regulated by cAMP in swollen sperm of *S. purpuratus* and *L. pictus* sea urchins.

Using the cell-attached configuration of the patch-clamp technique, we recorded two different single channel conductances of 31 and 43 pS. Both conductances are weakly voltage dependent, monovalent cation permeable and modulated by membrane permeable analogues of cAMP. Possibly one channel with two states may explain the two main conductances observed. The protein kinase inhibitor H7 does not inhibit channel activation by db-cAMP, suggesting a direct modulation by the cyclic nucleotide. The channel is only about 3 times more permeable to K<sup>+</sup> than to Na<sup>+</sup>. As a consequence of its selectivity, activation of this channel under physiological conditions would lead to sperm depolarization due to Na<sup>+</sup> influx. The potential role for this depolarization in the speract response is discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biochemical and biological material

Inorganic salts, db-cAMP, 8Br-cAMP, 8Br-cGMP and IBMX, were from Sigma (St. Louis, MO, USA). H7 was from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and synthetic speract was from Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA). *S. purpuratus* and *L. pictus* sea urchins were from Marinus (Long Beach, CA, USA). Sperm were obtained as previously described [5]. The sperm suspension was diluted 1/60 in low Ca<sup>2+</sup> artificial seawater (ASW) containing in mM: 486 NaCl, 10 KCl, 26 MgCl<sub>2</sub>, 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.1 EDTA, 2.5 NaHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES-Na, pH 7.0 (955 mOsm).

### 2.2. Patch-clamp experiments

Sperm were swollen as described [6], using modified 10-fold diluted ASW containing in mM: 49 NaCl, 1 KCl, 25 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0.1 EDTA, 10 HEPES-Na, pH 7.0 (155 mOsm). This solution was used in the bath chamber in all experiments. Patch pipettes of 25–65 MΩ resistance were filled with a solution containing 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES-Na, pH 7.0. Sperm were visualized under phase contrast microscopy and patch clamped in the cell-attached configuration with an Axopatch-200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Single channel currents were digitized at 5 kHz and filtered on line at 2 kHz. The inhibitors and cyclic nucleotides were perfused changing the whole bath solution. All experiments were performed at 20°C.

\*Corresponding author. Fax: (52)-73-17 23 88.

E-mail address: darszon@ibt.unam.mx (A. Darszon).

**Abbreviations:** AR, acrosome reaction; ASW, artificial sea water; 8Br-cAMP, 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate; 8Br-cGMP, 8-bromoguanosine 3':5'-cyclic monophosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; db-cAMP, N<sup>2</sup>,2'-O-dibutyryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate; V<sub>m</sub>, transmembrane potential; V<sub>c</sub>, command potential; V<sub>r</sub>, resting membrane potential; V<sub>rev</sub>, reversal potential; HCN, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated; H7, 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; pH<sub>i</sub>, intracellular pH; SPIH, hyperpolarization- and nucleotide-activated channel from sea urchin sperm

### 2.3. Data analysis

Single channel currents were filtered at 500 kHz and analyzed using pClamp v.6.0. The applied potential was transformed to a calculated membrane potential according to the cell-attached configuration convention. The relation between command potential ( $V_c$ ) and transmembrane potential ( $V_m$ ) is:

$$V_m = V_r - V_c$$

where  $V_r$  is the resting membrane potential [16]. A value of  $-50$  mV was used for  $V_r$  in the calculations, as reported from membrane potential measurements with fluorescent probes in swollen sperm populations [17].

Relative ion permeability ( $P_{K^-}/P_{Na^+}$ ) was calculated with the Goldman-Hodgkin-Katz equation [18]:

$$\frac{P_{K^-}}{P_{Na^+}} = \frac{[Na^+]_i \exp(-zFV_m/RT) - [Na^+]_o}{[K^+]_o - [K^+]_i \exp(zFV_m/RT)}$$

where  $z$  is the valence of the ions,  $F$  is the Faraday constant,  $R$  is the gas constant,  $T$  is the temperature in Kelvin degrees and  $V_{rev}$  is the reversal potential.  $V_{rev}$  was estimated from the average current-voltage ( $I-V$ ) curve of the single channel transitions from five experiments.

## 3. Results

### 3.1. 'Cell-attached' recording of cation-selective channels in swollen sea urchin sperm

Sea urchin sperm have a collection of ionic channels that participate in their physiological responses to egg jelly components. Mostly these ion channels have been studied with fluorescent dyes in sperm and in membrane vesicles or incor-

porating sperm plasma membranes into planar lipid bilayers [8]. To overcome the difficulties of patch clamping sea urchin sperm ( $\sim 3\%$  success rate) [13], the cells can be swollen in diluted ASW. This strategy allowed the detection of a 5 pS  $K^+$  channel activated by speract [6].

Here we have further documented that in swollen sperm ( $\sim 4$   $\mu$ m diameter) the success rate for obtaining high resistance seals increases to 33.5% (789 patches from 2356 attempts). Single channel activity was detected in 37% (292) of the high resistance seals.

### 3.2. Channel activation by db-cAMP

Failure to obtain whole cell or excised patch recordings in swollen sperm forced us to use membrane permeable cAMP analogues, like db-cAMP and 8Br-cAMP, to test the influence of cyclic nucleotides on the ion channels we record on cell-attached patches. Fig. 1A illustrates a channel that is modulated by db-cAMP. The channel's open probability ( $P_o$ ) increased after perfusion of 300  $\mu$ M of db-cAMP. Fig. 1B summarizes the external cyclic nucleotide dose dependence of channel activity. At 300  $\mu$ M db-cAMP, the  $P_o$  of the channel, estimated at zero applied voltage, increased 5.1-fold on average, from  $0.3 \pm 0.08\%$  to  $1.53 \pm 0.47\%$  ( $n=6$ ). At 1 mM db-cAMP,  $P_o$  increased 11.6-fold, to  $3.5 \pm 0.9\%$  ( $n=2$ ) (Fig. 1B). The dotted line is the best fit of the function:

$$f/f_0 = 1 + (f_{\max}([\text{db-cAMP}]/([\text{db-cAMP}] + K_d)))$$

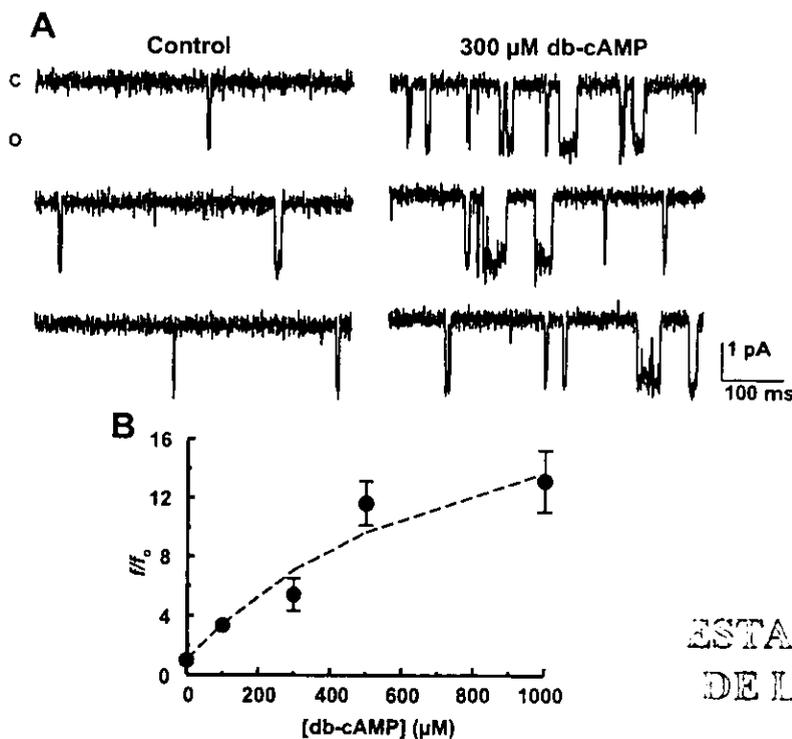


Fig. 1. db-cAMP upward modulation of a cationic channel from swollen sea urchin sperm. A: Representative traces of steady state single channel activity are shown at control conditions (left) and db cAMP (right). Single channel currents were recorded at zero applied voltage. Downward deflections indicate channel openings (O) from the closed state (C). The applied potential was transformed to the membrane potential as indicated in Section 2. The bath and pipette solutions are mentioned in Section 2 (B). Dose dependence study of channel  $P_o$  as a function of [db-cAMP]. Filled circles represent the ratio  $f/f_0$  where  $f$  is the fraction of open time at any [db-cAMP] and  $f_0$  the fraction of open time without db-cAMP, that was used as a normalized parameter to assay the effect of nucleotide on open probability. Each point represents the average open probability  $\pm$  S.E.M. obtained from 2–6 experiments.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

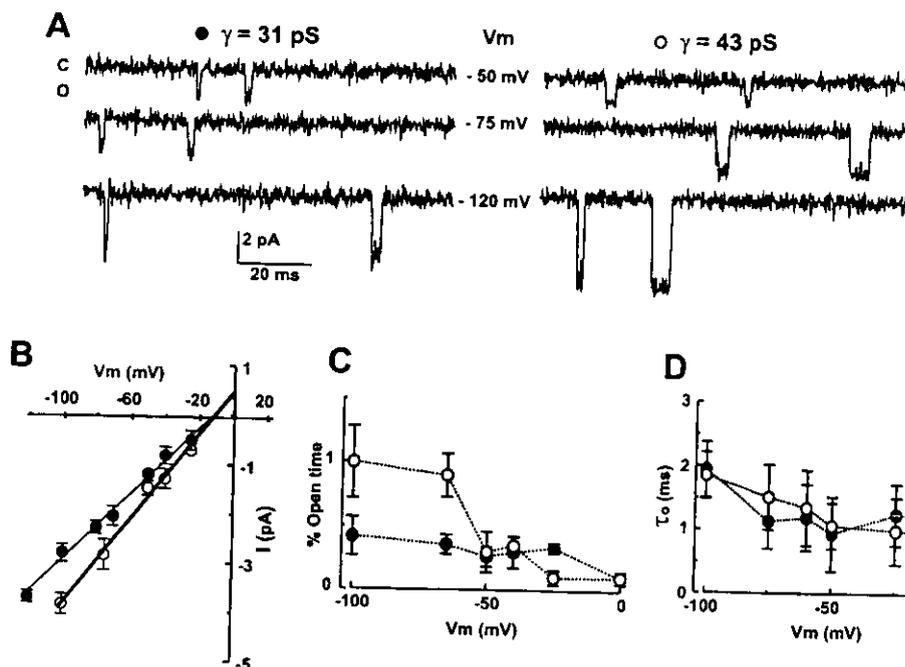


Fig. 2. Thirty-one and 43 pS cationic conductances in cell-attached patches from swollen sea urchin sperm. A: Representative single channel recordings at different membrane potentials under the same conditions as in Fig. 1. The left panel corresponds to the 31 pS conductance (filled circles in B,C,D) and the right panel to the 43 pS conductance (open circles in B,C,D). B: Current–voltage relationship for both conductances obtained from amplitude histograms at various applied voltages that were fitted with Gaussian distributions. The slope conductance and  $V_r$  were estimated from the linear fit to Ohm's equation (solid lines). C:  $P_o$  as a function of membrane potential, the fraction of open time (% open time) was calculated from the event list at each voltage. D: Open time duration ( $\tau_o$ ) as function of membrane potential. The mean open time was estimated from the distribution of open times at different potentials. Each point in B, C and D is the average from five different experiments and the bars are  $\pm$  S.E.M. The lines joining experimental points C and D were drawn by eye.

to the experimental data. In this equation,  $f$  is the fraction of open time at any db-cAMP concentration,  $f_0$  is the fraction of open time in the absence of the nucleotide,  $f_{max}$  is the value of  $f/f_0$  at very large [db-cAMP] and  $K_d$  is the apparent dissociation constant. Under these conditions  $K_d$  (876  $\mu$ m) is over-estimated since the intracellular concentration of db-cAMP is much lower than that added externally. 8Br-cAMP increased the activity of these channels in the same way as db-cAMP (not shown). In contrast, 8Br-cGMP, an analogue for cGMP, at concentrations  $> 200 \mu$ m did not influence the activity of the channels (not shown).

### 3.3. Characterization of the ionic conductances activated by db-cAMP

Fig. 2A shows steady state single channel recordings at different membrane potentials of the two main conductances modulated by db-cAMP in the absence of the analogue. Excursions between closed and open states of both conductances have fast kinetics: spike shaped transitions are frequently observed.

In our conditions, one of the main conductances (Fig. 2A right) was of  $43 \pm 1.7$  pS, calculated from the linear fit of the  $I$ - $V$  relation from five different experiments (Fig. 2B). The potential at which the current inverts (reversal potential) was  $-11.7 \pm 1.7$  mV, indicating cation selectivity. The channel responsible for these transitions displays a very low open probability ( $P_o$ ) at the tested applied voltages ( $P_o < 1\%$ ) and is only weakly voltage dependent (Fig. 2C). The fraction of time the channel spends in the open state depends slightly on the membrane potential. On the other hand the mean open

time ( $\tau_o$ ), estimated from the distribution of the open times, was essentially independent of membrane potential in the physiological range (Fig. 2D). The other main conductance found was of  $31 \pm 1.2$  pS (Fig. 2A left). The linear fit of the  $I$ - $V$  curve yields a reversal potential of  $-12.8 \pm 2.1$  mV, again indicating cation selectivity (Fig. 2B). The open probability of this transition is also very low ( $P_o < 1\%$ ) (Fig. 2C) and shows only a small voltage dependence in the 0 to  $-100$  mV range (Fig. 2D).

The permeability ratio,  $P_{K^+}/P_{Na^+}$ , estimated as explained in Section 2, was low for both the 31 and the 43 pS conductances (3.5 and 2.8, respectively) indicating that they only modestly select between  $K^+$  and  $Na^+$ .

As we can see, the two conductances reported here are very similar; they are cation selective, have a low open probability and are only slightly voltage dependent. Though we rarely found both conductances in the same recording, their shared properties could suggest that one channel with two sub-conductance states is responsible for them. On these grounds, in further analysis results from either conductance were pooled as if they belonged to the same channel protein.

### 3.4. Channel activation by cAMP

The intracellular concentration of cAMP, at any moment, is a balance between its synthesis by adenylate cyclase and its degradation by phosphodiesterases. IBMX, a phosphodiesterase inhibitor, elevates the intracellular concentration of cAMP in swollen sea urchin sperm [11,12]. Consistent with the idea that cAMP regulates the sea urchin sperm channel recorded here, perfusion of 100  $\mu$ m IBMX significantly increased  $P_o$

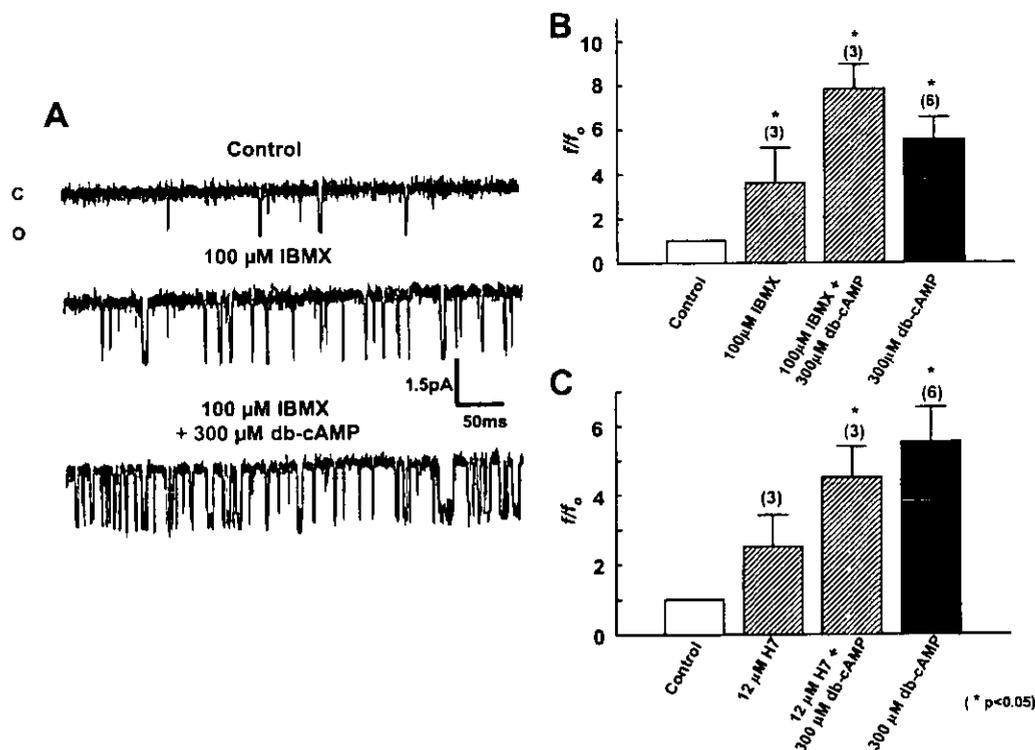


Fig. 3. Modulation of cationic channels from swollen sea urchin sperm by IBMX and H7. A: Single channel currents recorded as in Fig. 1. Representative traces of steady state single channel activity in control, IBMX or IBMX plus db-cAMP perfusion are shown. B: IBMX, db-cAMP and IBMX+db-cAMP increase  $P_o$ . C: H7 causes a non-significant increment in  $P_o$  and does not affect the  $P_o$  increase induced by db-cAMP. Each bar represents the ratio  $f/f_0$  where  $f$  is the fraction of open time in the presence of the tested compound and  $f_0$ , the fraction of open time without any treatment.  $f/f_0$  was used as a normalized parameter to assay the effect of different compounds on  $P_o$ . The bars represent  $\pm$  S.E.M. The numbers in parentheses above the bars indicate the number of experiments. (\*  $p < 0.05$ ).

(Fig. 3A). In these experiments the effects of IBMX and db-cAMP on both conductances were pooled. The  $P_o$  increment induced by this IBMX concentration was equivalent to that caused by 300  $\mu$ M db-cAMP alone (Fig. 3B). As expected, perfusion of 300  $\mu$ M db-cAMP in the presence of 100  $\mu$ M IBMX caused a more important increase in  $P_o$  (Fig. 3B).

### 3.5. H7, a protein kinase inhibitor, does not inhibit db-cAMP channel activation

Channel activation by cAMP could be due to direct binding of the nucleotide to the channel or indirectly by inducing a change in its phosphorylation state. We used a high concentration of H7, which inhibits protein kinases A, C and G, to study their participation in the cAMP-induced activation of the channels. The increase in channel  $P_o$  caused by db-cAMP was not influenced by H7 (Fig. 3C). Addition of 12  $\mu$ M H7 alone caused a small and not statistically significant increase in channel  $P_o$  (Fig. 3C), which could be explained if the channel is also modulated by its phosphorylation state [21].

## 4. Discussion

Sperm are very small yet by swelling them we have been able to characterize cation channels using the on-cell patch-clamp technique. We found evidence for two main single channel conductances of 31 and 43 pS activated by cAMP permeable analogues and by IBMX. Both conductances are cation selective, with a  $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 3$ , have a low open probability and are only slightly voltage dependent. Though rarely

present in the same recording, their biophysical properties suggest that one channel with two sub-conductance states is responsible for them. H7, an antagonist of several kinases did not inhibit channel activation by db-cAMP (Fig. 3C). Although this fact is consistent with a direct activation of channels by the cyclic nucleotide, it will be necessary to demonstrate this in isolated sperm membrane patches.

The channel characterized here has similarities with a  $K^+$  channel upwardly regulated by cAMP incorporated to planar bilayers by fusing purified flagellar membrane fragments obtained from *S. purpuratus* [14]. The kinetics and selectivity,  $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 4$ , of both channels are practically indistinguishable. However, the cationic single channel conductances reported here are significantly smaller than the 103 pS conductance of the channel described in planar bilayers. The different conditions used to study channels in bilayers and on cell-attached patches may explain, at least in part, why their conductances do not match.

In 1998 Gauss et al. cloned the first cyclic nucleotide-gated channel from the sea urchin sperm [15]. When expressed in a heterologous system, this channel is weakly  $K^+$  selective, activated by a hyperpolarization and by the direct action of cAMP. The channel, called 'hyperpolarization- and nucleotide-activated channel from sea urchin sperm' or simply SPIH, is mainly localized on the sperm flagellum [15] and was classified as a member of the family of HCN-gated channels [19]. Antibodies to SPIH also stain the flagella of *L. pictus* sperm (data not shown).

The SPIH channel shares multiple characteristics with the

planar bilayer channel and those characterized in this work. It is only about 4 times more permeable to  $K^+$  than to  $Na^+$  and its open probability is directly increased by cAMP, and only weakly by cGMP. In the absence of cAMP, SPIH macroscopic currents inactivate, while in its presence they do not. The cation channels we record on cell-attached patches do not inactivate; it is likely that in our experiments there is a basal cAMP concentration in the cytoplasm. To the best of our knowledge this is the first direct recording of cAMP-regulated channels in sea urchin sperm.

The only HCN-gated channel that has been studied at the single channel level is the HvHCN channel [19,20]. It was cloned from the silkworm antenna and is activated by cAMP and hyperpolarization. The HvHCN channel has a single channel conductance of 30 pS, is cationic and displays a  $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 3$  [20]. Its properties match markedly well those of the channel characterized here.

The SPIH channel is blocked by external  $\mu M$   $Cs^+$  [15] while the  $K^+$  channel modulated by cAMP in bilayers is blocked by external mM  $TEA^+$  and  $Ba^{2+}$  [14]. Though the cell-attached configuration is not ideal for ion channel pharmacology using non-permeable compounds, 10 mM  $Cs^+$  in the recording pipet failed to block the cation channels (data not shown). This finding suggests that the cation channels recorded in the present work may not be due to SPIH. However, it is possible that when expressed in heterologous systems some properties of SPIH channels may be different than in the sea urchin sperm. In addition, the ionic conditions are very different in the two systems. Conclusions about the identity, regulation and pharmacology of these channels require developing strategies that allow the whole cell and excised patch configurations. Spermatogenic cells may be an alternative, as it has for mammalian sperm [22,23].

Speract increases cGMP levels [9] and activates  $K^+$ -selective channels that hyperpolarize sperm [5,7]. The hyperpolarization is followed by a  $Na^+$  dependent repolarization and  $Ca^{2+}$  dependent depolarization [8,15]. In addition, the hyperpolarization stimulates a  $pH_i$  increase and adenylate cyclase is activated, elevating the levels of cAMP [11,12]. The cation channels described here would be activated by the hyperpolarization and by the increase in cAMP levels induced by speract. Considering that this channel displays a  $P_{K^+}/P_{Na^+} \sim 3$ , its opening under physiological conditions ( $\sim 0.5$  M external NaCl) would allow  $Na^+$  influx and sperm depolarization [14]. This channel could therefore contribute to repolarize sperm after the hyperpolarization induced by speract and explain the  $Na^+$  dependence of this event [15].

**Acknowledgements:** This work was supported by grants from CONACyT, DGAPA-UNAM, the Howard Hughes Medical Institute and the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology. The authors thank Claudia Treviño for the immunocytochemistry experiments and U.B. Kaupp for providing the anti-SPIH antibody, Ricardo Delgado for technical assistance with the electrophysiological techniques and Ricardo Felix and Ignacio López for critical reading of the manuscript.

## References

- [1] Suzuki, N., Nomura, K., Ohtake, H. and Isaka, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99, 1238–1244.
- [2] Hansbrough, J.R. and Garbers, D.L. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 1447–1452.
- [3] Bentley, J.K., Tubb, D.J. and Garbers, D.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 14859–14862.
- [4] Nishigaki, T. and Darszon, A. (2000) *Dev. Biol.* 223, 17–26.
- [5] Lee, H.C. and Garbers, D.L. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 16026–16032.
- [6] Babcock, D.F., Bosma, M.M., Battaglia, D.E. and Darszon, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6001–6005.
- [7] Galindo, B.E., Beltrán, C., Cragoe Jr., E.J. and Darszon, A. (2000) *Dev. Biol.* 221, 285–294.
- [8] Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T. and Espinosa, F. (1999) *Physiol. Rev.* 79, 481–510.
- [9] Garbers, D.L. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58, 719–742.
- [10] Cook, S.P. and Babcock, D.F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22402–22407.
- [11] Cook, S.P. and Babcock, D.F. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 22408–22413.
- [12] Beltrán, C., Zapata, O. and Darszon, A. (1996) *Biochemistry* 35, 7591–7598.
- [13] Guerrero, A., Sánchez, J.A. and Darszon, A. (1987) *FEBS Lett.* 2, 295–298.
- [14] Labarca, P., Santi, C., Zapata, O., Morales, E., Beltrán, C., Liévano, A. and Darszon, A. (1996) *Dev. Biol.* 174, 271–280.
- [15] Gauss, R., Seifert, R. and Kaupp, U.B. (1998) *Nature* 393, 583–587.
- [16] Neher, E. (1995) in: *Single Channel Recording* (Sakmann, B. and Neher, E., Eds.), pp. 147–153, Plenum Press, New York.
- [17] Reynaud, E., De la Torre, L., Zapata, O., Liévano, A. and Darszon, A. (1993) *FEBS Lett.* 329, 210–214.
- [18] Hille, B. (1992) in: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, pp. 147–153, Sinauer Associates, MA.
- [19] Kaupp, U.B. and Seifert, R. (2001) *Annu. Rev. Physiol.* 63, 235–257.
- [20] Krieger, J., Strobel, J., Vogl, A., Hanke, W. and Breer, H. (1999) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 255–267.
- [21] Levitan, I.B. (1994) *Annu. Rev. Physiol.* 56, 193–212.
- [22] Santi, C.M., Darszon, A. and Hernandez-Cruz, A. (1996) *Am. J. Physiol.* 271, C1583–C1593.
- [23] Arnoult, C., Cardullo, R.A., Lemos, J.R. and Florman, H.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13004–13009.